

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

FACTEURS QUI AFFECTENT L'ÉMISSION ET LA RÉPONSE DU
CHARANÇON DE LA PRUNE, *CONOTRACHELUS NENUPHAR* (HERBST),
AUX ODEURS SYNTHÉTIQUES ET NATURELLES DES PLANTES HÔTES ET
À LA PHÉROMONE AGRÉGATIVE NATURELLE ET SYNTHÉTIQUE

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR
VIRGINIA HOCK

MARS 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

De nombreuses personnes ont contribué à la production de la présente thèse. J'aimerais tout d'abord remercier Dr. Gérald Chouinard pour son importante contribution en matière d'encadrement et d'encouragement. J'aimerais également exprimer ma gratitude aux Dr. Éric Lucas et Dr. Daniel Cormier pour leurs conseils, commentaires, et soutien dans la réalisation et l'achèvement de ce projet. Ces trois personnes m'ont offert la superbe opportunité d'entreprendre des études doctorales et je tiens à les en remercier grandement.

Je désire également exprimer ma reconnaissance aux Dr. Tracy Leskey et Dr. Aijun Zhang qui m'ont aidé dans le projet, en m'accueillant lors de mon stage au Département d'Agriculture des États-Unis, et en commentant les chapitres que j'ai rédigés. M. Starker Wright et Mme Torri Hancock ont été d'une aide précieuse à l'occasion de mon stage, et ce fut un plaisir de travailler avec eux, de même qu'avec Mme Sylvie Bellerose et M. Franz Vanoosthuyse, qui m'ont assisté lors des expériences réalisés à l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement, et qui ont aussi apporté leur contribution par les discussions scientifiques. J'ai beaucoup apprécié le travail qu'ils ont effectué, de même que leurs encouragements et leur bon humeur.

Je souhaite aussi remercier l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement, l'Université du Québec à Montréal et le Département d'Agriculture des États-Unis de m'avoir permis d'entreprendre des études doctorales dans leurs institutions reconnues, ainsi que tous les employés qui m'ont aidé à mon la réalisation de mes travaux. Je désire aussi remercier le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec pour la contribution financière du projet de recherche.

Je désire dire un gros merci à mes amis et mes collègues qui m'ont grandement aidé au cours des dernières années.

Finalement, mes plus grands et sincères remerciements vont à tous les membres de ma famille, qui n'ont jamais cessé de m'encourager tout au long de cette grande aventure. Je tiens à remercier mes parents, Robert et Monika, pour leur support inébranlable qui m'a permis de me rendre là où je suis maintenant.

Enfin, je ne peux passer sous silence l'immense appui et la bonne humeur de mon mari Javier. Il a toujours été à mes côtés, me soutenant devant les obstacles et les difficultés reliés à ce projet. Je le remercie donc du fond de mon cœur.

DÉDICACE

J'aimerais dédier ce travail à Javier,
un homme extraordinaire,
à mon fils Vicente,
le plus beau cadeau de Noël jamais reçu,
et à ma petite nièce Porsha,
qui a toujours eu un beau sourire pour moi
peu importe les circonstances!

AVANT-PROPOS

Ce projet porte sur l'écologie chimique du charançon de la prune (ci-après CP), *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera : Curculionidae). Il vise plus spécifiquement à déterminer les produits volatils et les conditions favorisant l'attraction des adultes des deux souches, ainsi que les conditions provoquant une plus grande émission de la phéromone agrégative par les mâles. Cette information pourrait servir à déterminer les composés chimiques principaux de la formule complète de la phéromone agrégative, dont soit l'acide grandisoïque qui constitue le seul composé de cette phéromone identifié jusqu'à présent. Les résultats de cette recherche aideront à développer des pièges appâtés plus attractifs pour les adultes et offriront la possibilité de développer des méthodes de lutte plus écologiques contre ce ravageur.

Des essais ont été initialement réalisés à l'aide d'un olfactomètre à quatre voies pour déterminer la réponse olfactive des femelles à plusieurs odeurs perçues simultanément. Malheureusement, aucune réponse consistante n'a été obtenue (s'il vous plaît voir Annexe A). Un olfactomètre à deux voies plus grand et plus simple a donc été développé puis utilisé pour réévaluer la réponse du CP aux odeurs précédemment testées et une réponse positive et consistante a été obtenue lors d'essais préliminaires avec le CP. Il a donc été décidé d'utiliser l'olfactomètre à deux voies au lieu de l'olfactomètre à quatre voies pour tout le projet.

Le chapitre I, intitulé « Establishing abiotic and biotic factors necessary for reliable male pheromone emission and attraction to pheromones by female plum curculios *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) », le chapitre II, « Behavioral responses of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) to different enantiomer concentrations and blends of the synthetic aggregation pheromone grandisoic acid », et le chapitre IV, « Mites affect plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) behavioural

responses to attractive volatiles » ont été publiés, respectivement, dans « The Canadian Entomologist » (2014), « The Journal of Economic Entomology » (2015), et « The Canadian Entomologist » (2013). Le chapitre III, « Olfactometer responses of plum curculio *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) to host plant volatiles, synthetic grandisoic acid, and live conspecifics » a été soumis au « Journal of Insect Behaviour ». L'article en Annexe (s'il vous plaît voir Annexe B), « Evaluating electrophysiological and behavioral responses to volatiles for improvement of odor-baited trap tree management of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) » a été publié dans « The Journal of Environmental Entomology » (2014). Il s'agit d'une série d'études effectuées au Laboratoire de production fruitière intégrée de l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA) à Saint-Hyacinthe et à Saint-Bruno-de-Montarville, ainsi que lors d'un stage dans deux laboratoires appartenant au « Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture » (USDA-ARS). La première partie du stage s'est déroulée à l'Appalachian Fruit Research Station (AFRS) de Kearneysville en Virginie Occidentale dans le laboratoire du Dr. Tracy Leskey, où les travaux ont porté sur des techniques de collecte de produits volatils et d'électrophysiologie. La deuxième partie s'est déroulée au « Plant Science Institute » (PSI) de Beltsville au Maryland, où ont été réalisées des analyses avec les composés volatils obtenus lors des collectes faites à l'IRDA et à l'AFRS. Des expérimentations avec une technique de chromatographie en phase gazeuse – combinée à la détection électroantennographique (dont les résultats ne peuvent être présentés ici pour des raisons de confidentialité requises par le USDA) ont également été réalisées.

Les lignes directrices de toutes les expérimentations rapportées aux chapitres I et II ont été établies par l'ensemble des auteurs et les tests ont été conçus, réalisés et analysés par l'auteure de ces lignes d'un commun accord avec les autres auteurs. Les noms des auteurs sont, dans l'ordre : Virginia Hock (UQAM et IRDA), Gérald Chouinard (IRDA), Éric Lucas (UQAM), Daniel Cormier (IRDA), Tracy Leskey (USDA-ARS-

AFRS), Starker Wright (USDA-ARS-AFRS), Aijun Zhang (USDA-ARS-PSI) et André Pichette (Université du Québec à Chicoutimi) (UQAC).

Les lignes directrices d'expérimentation du chapitre III ont été établies par l'ensemble des auteurs et les tests ont été conçus, réalisés et analysés par l'auteure de ces lignes d'un commun accord avec les autres auteurs. Les noms des auteurs sont, dans l'ordre : Virginia Hock, Gérald Chouinard, Éric Lucas, Daniel Cormier, Tracy Leskey et Aijun Zhang.

Les lignes directrices du chapitre IV ont été établies par l'ensemble des auteurs et les tests ont été conçus, réalisés et analysés par l'auteure de ces lignes d'un commun accord avec les autres auteurs. Les noms des auteurs sont, dans l'ordre : Virginia Hock, Gérald Chouinard, Éric Lucas et Daniel Cormier.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
DÉDICACE	V
AVANT-PROPOS	VII
LISTE DES FIGURES.....	XVII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIX
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	XXI
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	XXIII
RÉSUMÉ	XXV
INTRODUCTION	1
Pomiculture	1
Charançon de la prune (CP)	1
Distribution du CP et de plantes hôtes	2
Cycle de vie du CP	3
Photopériode et comportement saisonnier	5
Température	6
Pluie et humidité	6
Vent et pression barométrique	7
Facteurs biotiques.....	8
Détection du CP	9
Dépistage par battage	9
Dépistage par détection visuelle.....	10
Piégeage.....	10
Lutte chimique	11
Lutte biologique et intégrée	14
Lutte par écomone.....	16
Odeurs de plantes hôtes.....	18

Phéromone agrégative	19
Phéromone synthétique	22
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES	25
Première hypothèse et justification	27
Objectifs et prédictions de cette hypothèse	27
Deuxième hypothèse et justification	28
Objectifs et prédictions de cette hypothèse	28
Troisième hypothèse et justification	29
Objectifs et prédictions de cette hypothèse	29
Quatrième hypothèse et justification	30
Objectifs et prédictions de cette hypothèse	30
CHAPITRE I	
ESTABLISHING ABIOTIC AND BIOTIC FACTORS NECESSARY FOR RELIABLE MALE PHEROMONE EMISSION AND ATTRACTION TO PHEROMONES BY FEMALE PLUM CURCULIOS <i>CONOTRACHELUS</i> <i>NENUPHAR</i> (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)	35
1.1 Mise en contexte	35
1.2A Résumé	36
1.2B Abstract	38
1.3 Introduction	40
1.4 Materials and Methods	44
1.4.1 Bioassays	44
1.4.2 Headspace collections	48
1.4.3 EAG trials	51
1.4.4 Statistical analysis.	56
1.5 Results	57
1.5.1 Bioassays	57
1.5.2 Headspace	58
1.5.3 EAG trials	60

1.6 Discussion	61
1.6.1 Bioassays.....	61
1.6.2 Headspace collections	65
1.6.3 EAG trials.....	66
1.7 Acknowledgements	69
1.8 Bibliography.....	70

CHAPITRE II

BEHAVIORAL RESPONSES OF PLUM CURCULIO (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) TO DIFFERENT ENANTIOMER CONCENTRATIONS AND BLENDS OF THE SYNTHETIC AGGREGATION PHEROMONE GRANDISOIC ACID	87
2.1 Mise en contexte	87
2.2A Résumé	89
2.2B Abstract	90
2.3 Introduction	92
2.4 Materials and Methods.....	94
2.4.1 Plum curculio.	94
2.4.2 Olfactometer	95
2.4.3 Experimental conditions.....	96
2.4.4 Source material.....	97
2.4.5 Procedure for oxidation of racemic grandisol	97
2.4.6 Pheromone mixtures and concentrations at different enantiomeric purities.....	99
2.4.7 Statistical analysis	100
2.5 Results	101
2.6 Discussion	103
2.7 Acknowledgements	107
2.8 Bibliography.....	109

CHAPITRE III

OLFACTOMETER RESPONSES OF PLUM CURCULIO <i>CONOTRACHELUS</i>	
<i>NENUPHAR</i> (HERBST) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) TO HOST	
PLANT VOLATILES, SYNTHETIC GRANDISOIC ACID, AND LIVE	
CONSPECIFICS	119
3.1 Mise en contexte	119
3.2A Résumé	120
3.2B Abstract	121
3.3 Introduction	123
3.4 Materials and Methods	126
3.4.1 Plum curculio	126
3.4.2 Olfactometer	128
3.4.3 Experimental conditions	129
3.4.4 Source material	130
3.4.5 Statistical analysis	132
3.5 Results	132
3.5.1 Female response to synthetic host plant odours	132
3.5.2 Response of different ages of females to PE	133
3.5.3 Fed vs. starved females response to PE alone or with (+)GA	133
3.5.4 Response of fed and starved females to natural host plant odours	134
3.5.5 Mated and virgin female response to PE alone or with two males	135
3.5.6 Female response during scotophase	136
3.6 Discussion	136
3.7 Acknowledgements	143
3.8 Bibliography	144
CHAPITRE IV	
MITES AFFECT PLUM CURCULIO (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)	
BEHAVIOURAL RESPONSES TO ATTRACTIVE VOLATILES	159
4.1 Mise en contexte	159
4.2A Résumé	161

4.2B Abstract	161
4.3 Introduction	163
4.4 Materials and Methods	165
4.4.1 Identification of mites	165
4.4.2 Plum curculio	166
4.4.3 Source material	167
4.4.4 Olfactometer	168
4.4.5 Experimental conditions	168
4.4.6 Statistical analysis	169
4.5 Results	170
4.6 Discussion	171
4.7 Acknowledgements	173
4.8 Bibliography	174
CONCLUSION	181
Sommaire	181
Pertinence	182
ANNEXE A	
OLFACTOMÈTRE À QUATRE VOIES	195
ANNEXE B	
EVALUATING ELETROPHYSIOLOGICAL AND BEHAVIORAL REPSONSES OF VOLATILES FOR IMPROVEMENT OF ODOR-BAITED TRAP TREE MANAGEMENT OF <i>CONOTRACHELUS NENUPHAR</i> (HERBST) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)	201
BIBLIOGRAPHIE	233

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.0	Charançon de la prune <i>Conotrachelus nemuphar</i> (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) adulte (Photo par Virginia Hock).....	32
2.0	Dommages causés par le charançon de la prune adulte (Photo par Virginia Hock)	33
1.1	Appareil de collecte de substances volatiles des expériences (headspace). A. Schématique. B. Configuration réelle	79
1.2	Réponse des femelles à l'odeur de différents nombres de mâles du charançon de la prune univoltine et multivoltine.....	80
1.3	Réponse des femelles à l'odeur de mâles de différents âges du charançon de la prune univoltine et multivoltine	81
1.4	Réponse des femelles vierges et accouplées à l'odeur de deux mâles du charançon de la prune, des races univoltine et multivoltine	82
1.5	Émission moyenne d'acide grandisoïque par huit mâles vierges de la souche multivoltine pendant les 40 premiers jours de leur vie adulte durant les collectes des substances volatiles (headspace).....	83
2.1	Pourcentage des femelles répondant aux différentes concentrations d'acide grandisoïque(+) avec une pureté de 72 % dans un olfactomètre à deux voies. A. Souche univoltine. B. Souche multivoltine	117
2.2	Pourcentage des femelles répondant aux différentes puretés de 2×10^{-7} mg/mL des énantiomères de l'acide grandisoïque dans un olfactomètre à deux voies. A. Souche univoltine. B. Souche multivoltine.....	118

3.1	Réponse des femelles (matures et nourries) de la souche univoltine aux différents composés volatils de plantes hôtes dans un olfactomètre à deux voies	153
3.2	Réponse des femelles de souche univoltine d'âges différents à l'essence de prune dans un olfactomètre à deux voies	154
3.3	Réponse des femelles à jeun pendant 24 h de souches univoltine et multivoltine aux composés volatils des plantes hôtes dans un olfactomètre à deux voies	155
3.4	Réponse des femelles nourries de souche univoltine aux différents composés volatils de plantes hôtes (naturels et synthétiques) dans un olfactomètre à deux voies	156
4.1	Schéma de l'olfactomètre utilisé dans les expériences	179

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Émission de l'acide grandisoïque détecté dans chaque traitement pendant les collectes de substances volatiles (expériences headspace).....	84
1.2 Sommaire des résultats des analyses statistiques sur l'influence des traitements de l'émission de l'acide grandisoïque pendant les collectes de substances volatiles (expériences headspace).....	85
1.3 Réponses moyennes des charançons de la prune adultes lors des essais électroantennographiques pour chaque composé volatil synthétique	86
2.1 Réponses des charançons de la prune femelles aux différentes concentrations et puretés (excès énantiomérique) de différents énantiomères d'acide grandisoïque dans un olfactomètre à deux voies.....	116
3.1 Réponses des charançons de la prune femelles aux différents composés volatils dans un olfactomètre à deux voies	157
4.1 Attraction des charançons de la prune femelles de la souche univoltine infestés ou non par des acariens aux composés volatils. I. Répondeurs et non-répondeurs, II. Répondeurs seulement.....	180
5.0 Sommaire des résultats des expériences olfactométriques.....	193
5.1 Sommaire des résultats des expériences de collectes des substances volatiles de la phéromone (headspace) et des essais électrophysiologiques	194

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AE	Ester de pomme
AFRS	Appalachian Fruit Research Station
AG	acide grandisoïque
AG(+)	l'énantiomère (+) de l'acide grandisoïque ((+)-(1R,2S)-méthyle-2-(1-méthyléthényl) cyclobutaneacetic acide)
AG(-)	l'énantiomère (-) de l'acide grandisoïque ((-)-(1R,2S)-méthyle-2-(1-méthyléthényl) cyclobutaneacetic acide)
ARS	Agricultural Research Service
BE	Essence de bleuet
BEN	Benzaldéhyde
<i>c.-à-d.</i>	C'est à dire
CP	Charançon de la prune
DCM	Dichlorométhane
EAG	Électroantennogramme
ee	Excès énantiomérique
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i> , par exemple
Fig.	Figure
GC-EAD	Chromatographie en phase gazeuse combinée à la détection électroantennographique
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse
GLM	Modèle linéaire généralisé
Headspace	espace de tête (collecte des composés olfactifs odorants présents dans l'air environnant)
<i>i.e.</i>	<i>Id est</i> , c'est-à-dire
IRDA	Institut de recherche et de développement en agroenvironnement
MAE	Essence de pomme McIntosh
MAPAQ	Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec
NIFA	National Institute of Food and Agriculture
<i>p. ex.</i>	Par exemple
PE	Essence de prune
PSI	Plant Science Institute
R.H.	Humidité relative
S.E.	Erreur-type d'une méthode d'estimation
<i>sp.</i>	Espèce
TLC	Chromatographie sur couche mince
T2H	Trans-2-hexénal
USDA	United States Department of Agriculture
UQAC	Université du Québec à Chicoutimi
UQAM	Université du Québec à Montréal

xxii

<i>vs</i>	<i>Versus</i> , par rapport à
5TA	Cinq pommettes
5TPA	Cinq pommettes perforées

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

°C	Degré Celsius
°C/min	Degré Celsius par minute
cm	Centimètre
©	Droit d'auteur
<i>df</i>	Degré de liberté
eV	Électronvolt
g	Gramme
ha	Hectare
h	Heure
L:D	Lumière/obscurité
L	Litre
L/min	Litre par minute
M	Molarité (moles par litre)
m	Mètre
mg	Milligramme
mg/mL	Milligramme par millilitre
mg/day	Milligramme par jour
mL	Millilitre
mm	Millimètre
mmol	Millimole
mV	Millivolt
Ø	Diamètre
®	Marque déposée
™	Marque de commerce
µg	Microgramme
µL	Microlitre
W	Watt
wk	Semaine
x	Par (multiplication)
χ^2	Test du Khi deux

RÉSUMÉ

La présente thèse porte sur l'écologie chimique du charançon de la prune (ci-après CP), *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera : Curculionidae), plus précisément sur les facteurs abiotiques et biotiques qui affectent l'émission et la réponse à la phéromone des souches univoltine et multivoltine de cet insecte. Le CP est un ravageur majeur des vergers de pommiers en Amérique du Nord et sa détection est très difficile en raison de la faible efficacité des pièges. Les essais effectués dans cette étude permettent de mieux comprendre le rôle de la phéromone agrégative et de d'autres composés olfactifs dans le comportement du CP mâle et femelle des deux souches, et de comprendre également comment ils interagissent avec leur environnement. L'étude a permis d'évaluer la réponse comportementale du CP en présence de composés olfactifs synthétiques ou naturels de plantes hôtes et de la phéromone agrégative du CP, sous différentes conditions physiologiques (âge, statut sexuel, etc.). De plus, des essais ont été effectués pour évaluer l'émission de la phéromone des CP mâles adultes selon plusieurs paramètres (température, humidité, etc.), afin de déterminer les conditions de l'émission maximale de phéromone. Des études électroantennographiques ont aussi été effectuées afin de déterminer sous quelle forme (énantiomères, mélanges etc.) cette phéromone peut être détectée par les antennes du CP. Les travaux visaient également à établir une relation entre le niveau de pureté de la composante principale de la phéromone agrégative (l'acide grandisoïque) et son pouvoir attractif sur le CP adulte. Dans un verger, il peut exister une compétition entre la phéromone naturelle émise par les mâles et sa forme synthétique utilisée dans les pièges appâtés. Pour s'assurer d'un bon dépistage du CP dans un verger, la forme synthétique de la phéromone doit pouvoir l'attirer efficacement. L'étude a aussi permis d'évaluer le pouvoir attractif de la molécule sous forme synthétique durant les périodes d'émission de la phéromone et la synergie avec des composés olfactifs provenant de plantes hôtes. Le comportement du CP adulte a été évalué selon plusieurs paramètres physiologiques (âge, statut sexuel, etc.), en présence de composés volatils synthétiques ou naturels, seuls ou combinés avec la phéromone agrégative.

Dans le premier chapitre, l'objectif était de déterminer quels étaient les facteurs biologiques (âge, nombre de mâles, statut d'accouplement) qui influencent la réponse des femelles face aux mâles. Des tests ont été effectués dans un olfactomètre vertical à deux voies, sans pression d'air avec des mâles vivants comme émetteurs de la phéromone d'agrégation, et des femelles comme réceptrices des composés olfactifs. Les résultats ont révélé qu'autant pour la souche univoltine que multivoltine, l'odeur de deux mâles vierges matures a suscité la plus grande attraction des femelles vierges matures par rapport à d'autres groupes d'âges et à d'autres quantités de mâles. Les femelles fécondées n'ont pas répondu aussi fortement aux composés olfactifs des mâles

vierges que les femelles vierges. Cela indique que deux mâles matures représentent le nombre nécessaire pour produire la quantité optimale de composés olfactifs pour attirer les femelles. De plus, des essais sur l'émission de la phéromone agrégative par le CP ont été effectués selon plusieurs paramètres (différents fruits, taux d'humidité, température, etc.). Les résultats indiquent que le CP produit une plus grande quantité de phéromone en présence des fruits de son hôte préféré (prunes) et d'un taux d'humidité élevé. Les essais électroantennographiques ont aussi validé les réponses du CP à la phéromone synthétique.

Dans le second chapitre, l'objectif était de déterminer quels mélanges phéromonaux (*p. ex.* énantiomère, concentration, niveau de pureté) déterraient le plus grand pouvoir attractif sur les femelles. Des tests ont été effectués dans un olfactomètre vertical à deux voies, sans pression d'air, en utilisant la forme synthétique du composé principal de la phéromone d'agrégation du CP et des femelles vivantes comme réceptrices. Les résultats ont révélé que, pour les souches univoltine et multivoltine, la plus grande pureté (72 %) de l'énantiomère (+) de l'acide grandisoïque provoquait une plus forte attraction chez les femelles matures vierges. Les deux souches ont été attirées par de faibles concentrations de cet énantiomère, mais la concentration à laquelle l'énantiomère (+) provoquait la plus forte attraction pour les femelles différait selon les souches (2×10^{-7} mg/mL pour la souche univoltine, 2×10^{-9} mg/mL pour la souche multivoltine).

Dans le troisième chapitre, l'objectif était de déterminer : 1) quelles substances volatiles issues des plantes hôtes (naturelles ou synthétiques) étaient les plus attractives pour le CP, et 2) les synergies éventuelles entre ces dernières et les composés olfactifs des mâles ou de la phéromone synthétique. Les femelles des souches univoltine et multivoltine ont été exposées à différents composés olfactifs de plantes hôtes et à la phéromone dans un olfactomètre vertical à deux voies. Les femelles matures ont répondu davantage au composé volatil synthétique de l'essence de prune qu'aux autres composés synthétiques olfactifs et les femelles à jeun n'ont pas démontré une attraction accrue envers l'essence de prune. Les autres composés synthétiques testés (*p. ex.* : trans-2-hexénal, benzaldéhyde, essence de pommes, essence de bleuets), également présents chez les plantes hôtes, n'ont pas suscité d'attraction mais certains ont agi dans certaines conditions comme répulsifs. L'odeur naturelle des pommes a par ailleurs démontré un pouvoir attractif sur les femelles à jeun. L'essence artificielle de prune utilisée en mélange n'a pas démontré d'effet synergique, ni avec l'odeur des deux mâles, ni avec l'énantiomère (+) de la forme synthétique de la phéromone agrégative (l'acide grandisoïque). Les réponses à ces combinaisons de composés olfactifs n'ont pas été plus fortes chez les femelles à jeun que chez les femelles nourries.

Le quatrième chapitre portait sur une infestation d'acariens phorétiques du genre *Histiostoma* (Acari: Histiostomatidae) qui s'est produite durant l'élevage de la souche univoltine du charançon de la prune. Des essais olfactométriques effectués sur des CP infestés et non infestés, à l'aide d'un olfactomètre vertical à deux voies, sans pression d'air, ont révélé un effet des acariens sur la réponse des charançons aux substances attractives. Pour les composés synthétiques (essence de prune) et naturels (deux mâles) ayant précédemment manifestés un pouvoir attractif sur les CP, significativement moins de CP infestés par des acariens qui ont répondu aux composés olfactifs que de CP non infestés. Cependant, tous les CP infestés qui ont répondu, l'ont fait de la même façon que les CP non infestés aux composés volatils testés. Cela indique que les acariens affectent la capacité du CP à répondre aux composés volatils attractifs, mais n'affectent pas leurs préférences.

Globalement, cette étude a démontré que le CP émet une phéromone agrégative et que cette émission varie en fonction de sa condition physiologique et de son environnement (humidité, température, etc.). Le CP possède des récepteurs qui permettent la détection de composés olfactifs comme la phéromone synthétique et les composés volatils des plantes hôtes, qu'il s'agisse d'attraction, comme avec l'odeur de prune « Stanley », de répulsion, comme avec le trans-2-hexénal. Les résultats indiquent que, comme chez d'autres espèces d'insectes, les adultes du CP sont attirés par plusieurs composés volatils synthétiques (*p.ex.* l'essence de prune et l'acide grandisoïque, pouvant se retrouver dans les plantes hôtes ou dans la phéromone de l'insecte) et naturels (émis par les mâles ou par les plantes hôtes), et que la réponse varie selon la source d'odeur (composés, énantiomères, taux d'émission, etc.) et le statut physiologique du CP (âge, à jeun ou non, statut sexuel). Les expériences menées ont permis d'identifier les conditions favorables pour l'émission de la phéromone qui pourront être reproduites dans de futures études sur la composition chimique complète de la phéromone agrégative. De plus, les résultats suggèrent des conditions dans lesquelles le CP serait davantage attiré vers des pièges appâtés installés dans les vergers et des conditions pouvant limiter ou empêcher sa réponse aux composés attractifs (infestation d'acariens, faible humidité, etc.). Les charançons utilisent les composés olfactifs de la phéromone et des plantes pour trouver des sources de nourriture, des partenaires sexuels et des sites de ponte. Les composés olfactifs jouent donc un grand rôle sur le comportement, la reproduction et la survie du CP. Afin de lutter contre ce ravageur, il est primordial de bien comprendre les divers aspects de son comportement, sa physiologie et sa biologie.

MOTS-CLÉS : Phéromone agrégative, acide grandisoïque, EGA, olfactomètre, sémiochimique, attractif, répulsif, odeurs, produits volatils, plante hôte, synergie, charançon de la prune, *Conotrachelus nemuphar*, coléoptère, Curculionidae.

INTRODUCTION

La pomiculture

La pomiculture est l'une des industries fruitières les plus importantes du Québec (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, 2004; Fédération des producteurs de pommes du Québec, 2008; Statistiques Canada, 2008). Elle est très développée et a généré des revenus importants, d'environ 46,5 millions de dollars en 2008 (Institut de la Statistique du Québec, 2008). La production québécoise de pommes représente près de 30 % de la production canadienne (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, 2004; Statistiques Canada, 2005, 2008; Fédération des producteurs de pommes du Québec, 2008). En 2011, la production commerciale de pommes au Canada était de 430 301 tonnes, représentant une valeur de 160,5 millions de dollars, soit 50 % de la production de tous les fruits produits au pays (827 197 tonnes). Cette culture est affectée par de nombreuses espèces d'insectes dont le charançon de la prune (ci-après CP), *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera : Curculionidae).

Charançon de la prune (CP)

Le CP est l'un des insectes ravageurs les plus importants dans les cultures de pommes du Québec et de tout l'est de l'Amérique du Nord (Chouinard *et al.*, 2001). Le CP adulte mesure environ 4-6 mm (Chapman, 1938; Racette, 1988) et porte sur ses élytres un patron tacheté de noir, de gris et de brun (Quaintance et Jenne, 1912), ce qui rend difficile son observation dans la nature (Figure 1.0). Les mâles peuvent être facilement distingués des femelles par la concavité de la portion ventrale de leurs sternites

métathoraciques qui est convexe chez les femelles (Thomson, 1932), un outil d'indentification important étant donné le fait que les femelles causent plus de dégâts que les mâles et qu'elles sont souvent ciblées pour les expériences.

Il existe deux souches du CP : la souche univoltine et la souche multivoltine (Schoene, 1936; Hallman et Gould, 2004; Vincent *et al.*, 2004). La souche univoltine produit une seule génération par année et se retrouve au Canada et au nord des États-Unis. Cette souche se caractérise par une diapause reproductive obligatoire pendant l'hiver, c'est-à-dire qu'elle doit passer par une phase de maturation sexuelle et ne peut donc pas s'accoupler et produire d'œufs avant l'arrivée du printemps (Bobb, 1952; Smith et Salkeld, 1964). La souche multivoltine est présente au sud des États-Unis, de la Virginie-Occidentale jusqu'à la Floride. La souche multivoltine compte deux générations par année avec une diapause facultative (Smith, 1957; Smith et Flessel, 1968). Les deux souches ne peuvent pas se reproduire entre elles (Padula et Smith, 1971; Zhang et Pfeiffer, 2008).

Distribution du CP et des plantes hôtes

Le CP est un insecte indigène de l'Amérique du Nord présent aux États-Unis dans l'état du Utah et de l'Idaho (Chapman, 1938; Alston et Stark, 2000; Kim et Alston, 2008), de l'île d'Orléans jusqu'à la Floride, et au Canada à l'Est des Rocheuses. (Quaintance et Jenne, 1912; Paradis, 1956; Vincent *et al.*, 2004). Cet insecte peut se retrouver sur un grand nombre de plantes de la famille des Rosacées et s'attaque de manière typique aux cultures fruitières à pépins et à noyau (Chapman, 1938; Armstrong, 1958; Racette *et al.*, 1992; Hallman et Gould, 2004). Il peut également s'en prendre à l'aubépine (*Crataegus*), aux bleuets (*Ericaceae*), et à certains fruits tropicaux (Wylie, 1966; Maier, 1990; Hallman et Gould, 2004; Jenkins *et al.*, 2006). Les plantes hôtes du CP

sont par ordre de préférence: la prune, la pêche, la cerise, l'abricot, la pomme, la poire, le coing, la nectarine et le bleuet (Quaintance et Jenne, 1912; Leskey et Wright, 2007). Ces fruits ont une importance économique (Levine et Hall, 1977) variable selon les régions (Garman et Zappe, 1929; Stearns *et al.*, 1935). Au nord-est de l'Amérique, les dommages du CP sur les pommes sont plus importants que sur les pêches, contrairement au sud-est où les pêches sont davantage attaquées que les pommes (Akotsen-Mensah, 2010). Dans l'état de Géorgie, les pêches sont davantage ciblées que les prunes (Yonce *et al.*, 1995). Cependant, les différences peuvent être dues à la disponibilité des fruits dans chaque région, plutôt qu'à une différence réelle due à la préférence du CP pour certaines espèces de fruits.

Cycle de vie du CP

Au Québec, les adultes du CP sortent de leur hibernation du sol ou de la litière de bois à proximité des vergers où ils ont passé l'hiver, de la fin avril jusqu'à la mi-mai et commencent alors à se disperser dans les vergers (Lafleur et Hill, 1987). Les mâles arrivent en premier, suivis par les femelles (Smith et Flessel, 1968). Les femelles sont attirées par les odeurs des plantes hôtes (Leskey et Wright, 2007) et par une phéromone agrégative émise par les mâles CP (Eller et Bartelt, 1996). Les CP se déplacent d'abord vers les premières rangées de pommiers situés en bordure du verger pendant la floraison. La bordure est donc la première zone attaquée par les CP, un fait à retenir dans les stratégies de lutte contre cet insecte. Une fois dans les vergers, les adultes se nourrissent principalement des pommes non mûres (immatures) et s'accouplent (Lafleur et Hill, 1987). Les CP opèrent de minuscules perforations circulaires pendant qu'ils se nourrissent. À l'émergence de leur hibernation, les CP ne sont pas encore matures mais les CP adultes peuvent s'accoupler à partir du cinquième ou sixième jour (Johnson et Hays, 1969). En effet, les mâles peuvent produire du sperme aussi tôt que

le sixième jour et les femelles peuvent garder le sperme dans leur spermathèque jusqu'au moment où les œufs sont matures, et elles peuvent pondre aussi tôt que le huitième jour. Cependant, dans la nature, la maturité sexuelle est habituellement atteinte environ 13 jours après la sortie d'hibernation (Smith et Salkeld, 1964). La majorité des accouplements ont lieu quand l'adulte a un âge entre 16 et 20 jours (Johnson et Hays, 1969).

Après l'accouplement, et lorsque les pommettes atteignent un diamètre d'environ 6 mm, les femelles commencent à pondre leurs œufs (Whitcomb, 1933; Piñero et Prokopy, 2004). Pour ce faire, la femelle utilise son rostre pour percer la surface du fruit et y déposer un œuf par site de ponte (Armstrong, 1958; Mampe et Neunzig 1967; Calkins *et al.*, 1976). Elle taille ensuite une incision en forme de croissant sous le site d'oviposition, ce qui réduit la pression exercée sur l'œuf par la pommette en croissance et augmente la probabilité de survie des œufs et des jeunes larves (Chapman, 1938; Bobb, 1952; Butkewich *et al.*, 1987). Ces cicatrices provoquées par le comportement de ponte du CP sont utilisées pendant l'inspection visuelle pour déterminer le niveau d'attaque par cet insecte (Figure 2.0). Les fruits atteints peuvent être bosselés, noueux ou déformés à la récolte. En général, la limite des dommages acceptables dans les vergers est de l'ordre de 1% (Prokopy *et al.*, 2004).

Les femelles pondent habituellement un seul œuf par fruit (Butkewich *et al.*, 1987). Chaque femelle est capable de pondre entre 100 et 500 œufs pendant sa vie. Les œufs éclosent environ cinq jours après la ponte (Whalon *et al.*, 2000; Coombs, 2001). Les larves qui émergent des œufs passent par quatre stades larvaires dans les fruits (Snapp, 1930; Snapp, 1940; Amis et Snow, 1985) et vont se développer en se nourrissant des tissus végétatifs et des pépins des fruits, ce qui peut causer la chute prématurée de ces derniers (Levine et Hall, 1977). Les fruits matures infestés qui ne tombent pas de l'arbre peuvent contenir des larves, et donc ne sont pas commercialisés. De plus, les marques

d'alimentation et de ponte du CP facilitent la transmission des maladies fongiques telles que les moisissures. Au Québec c'est en juillet, au quatrième stade larvaire, que les larves quittent les pommes tombées au sol et entrent dans le sol pour la nymphose. Ces larves pénètrent dans le sol à une profondeur de 3 à 8 cm (Bobb, 1952).

L'émergence des adultes de la première génération a lieu environ 30 jours plus tard, en août (Amis et Snow, 1985). Les adultes de la souche univoltine ne sont pas matures à cette période. Ils se nourrissent des fruits au début de l'automne, avant d'entrer en diapause pour l'hiver. Les adultes de la souche multivoltine peuvent répéter le cycle d'accouplement et de ponte des œufs, mais la deuxième génération se nourrit de fruits et entre en diapause pour l'hiver plus tard à l'automne. Les adultes des deux souches migrent des vergers de pommiers vers les forêts pour passer l'hiver dans le sol ou sous la litière de bois, cela jusqu'au printemps suivant (Lafleur *et al.*, 1987; Akotsen-Mensah, 2010).

Photopériode et comportement saisonnier

Au début de la saison, le CP adulte est plus actif vers la fin de l'après-midi et en soirée; il est alors plutôt nocturne (Racette *et al.*, 1990; Chouinard *et al.*, 1992b; Dixon *et al.*, 1999). Cependant, il devient actif durant toute la journée plus tard dans la saison (Owens *et al.*, 1982; Racette *et al.*, 1991) si la température n'est pas trop froide (Chouinard *et al.*, 1994; Leskey et Prokopy, 2002). La période entre 16h00 et 24h00 demeure la période la plus active pour les CP (Chouinard *et al.*, 1993). En général, l'activité de cet insecte est influencée principalement par la température, la pression atmosphérique, le déficit de pression de vapeur (*c.-à.-d.* la différence entre la quantité d'humidité dans l'air ambiant par rapport à la quantité d'humidité que l'air ambiant peut contenir lorsque celui-ci en est saturé) et la phénologie du pommier (Chouinard *et*

al., 1991; Racette *et al.*, 1991). Prokopy *et al.* (1995) ont démontré que certaines longueurs d'onde (exemple : infra-rouge) ne perturbaient pas l'activité du CP. Pour l'avancement des techniques phytosanitaires (*p.ex.* détermination des composés secondaires de la phéromone agrégative émise par les mâles), les périodes telles que la scotophase, durant lesquelles le CP est le plus actif et donc peut produire plus de la phéromone, constituent un facteur d'une grande importance.

Température

La température influence non seulement le comportement saisonnier, la croissance et le développement du CP (Lan *et al.*, 2004), mais aussi sa façon de se déplacer. Les températures froides ($\leq 6\text{ °C}$) stoppent l'activité et le développement de l'espèce (Sarai, 1969; Piñero et Prokopy, 2004). Lorsque les températures sont fraîches (entre 15 et 19 °C), le CP demeure immobile ou se déplace en marchant; lorsqu'elles sont plus chaudes (entre 20 et 30 °C), le déplacement du CP se fait principalement en volant (Chouinard *et al.*, 1993, 1994; Leskey et Prokopy, 2002). Les températures plus chaudes supérieures à 30 °C ont un effet variable sur les mouvements du CP (Prokopy *et al.*, 1999). Le facteur température devait donc être considéré non seulement pour les évaluations en laboratoire du CP, mais aussi pour déterminer les types de pièges à utiliser et le moment idéal pour leur déploiement dans les vergers (Prokopy *et al.*, 1999; Lamothe *et al.*, 2008).

Pluie et humidité

Comme la température, la pluie a une grande influence sur l'émergence printanière du CP adulte (Lathrop, 1949; Bobb, 1949; Smith et Flessel, 1968) et sur le taux de survie de la nymphe en facilitant son émergence par l'ameublissement du sol (Bobb, 1952). Le CP est aussi très sensible à la dessiccation (Smith et Flessel, 1968; Butkewich et Prokopy, 1993). Des humidités relatives plus élevées ($> 65\%$) sont reliées à une plus grande ponte des femelles CP (Hoyt *et al.*, 1983; Le Blanc *et al.*, 1984; Chouinard *et al.*, 1994), de même qu'à une augmentation de leurs déplacements (McGiffen et Meyer, 1986; Chouinard *et al.*, 1992b; Dixon *et al.*, 1999). En raison de sa corrélation avec l'activité du CP, l'humidité peut donc influencer aussi l'émission et la réponse du CP à la phéromone agrégative, et par conséquent les captures dans les pièges. En milieu naturel par exemple, une humidité élevée peut augmenter l'émission de la phéromone, ce qui se traduit par une plus grande agrégation du CP dans le verger. Le taux d'humidité pourrait donc aider à prévoir les périodes propices pour le dépistage par piégeage (sur le terrain) ou la collecte de phéromone (en laboratoire).

Vent et pression barométrique

Le vent incite le CP à feindre la mort (thanatose) (Wigglesworth, 1953). C'est lors de périodes venteuses que les insectes adoptent ce comportement de thanatose en se laissant tomber au sol (Garman et Zappe, 1929). Le comportement de thanatose rend également extrêmement difficile les études comportementales sur cet insecte (Prokopy *et al.*, 1995). Ainsi, le CP est moins présent dans les arbres pendant ou après de forts vents (Chouinard *et al.*, 1992a; Dixon *et al.*, 1999). En absence de vent, le CP reste actif et a tendance à se déplacer davantage dans les airs qu'au sol, dans la mesure où la température est favorable au vol (Racette *et al.*, 1991; Prokopy et Wright, 1997; Prokopy *et al.*, 1999). Le vent peut donc influencer différemment les captures de CP, par les pièges ceinturant l'arbre (*p. ex.* les pièges de Circle, qui attrapent davantage les

CP qui marchent), ou par les pièges déposés sur le sol (*p. ex.* les pièges pyramidaux qui ciblent d'avantage les CP qui volent) (Prokopy *et al.*, 1999; Lamothe *et al.*, 2008). En laboratoire, la présence d'un courant d'air peut aussi initier le comportement de thanatose. Pour cette raison les tests olfactométriques sont habituellement réalisés sans courant d'air (Leskey et Prokopy, 2001; Akotsen-Mensah, 2010). La pression barométrique (la mesure de la pression exercée par le poids de l'air sur la Terre) peut aussi avoir un effet sur l'efficacité des pièges. En effet, le CP est beaucoup plus actif et se déplace plus fréquemment durant les journées à faible pression barométrique (Dixon *et al.*, 1999).

Il est important de noter que tous ces paramètres environnementaux interagissent les uns avec les autres et modulent le comportement du CP, qui est plus affairé le soir durant les périodes de haute humidité relative, avec peu de vent et une température chaude (Mulder *et al.*, 1997). En reproduisant ces conditions, il est possible d'améliorer les techniques de récolte et d'analyse de la phéromone agrégative.

Facteurs biotiques

Il existe des espèces de champignons, de bactéries et d'arthropodes qui peuvent s'attaquer aux larves, nymphes ou adultes du CP (Reissig *et al.*, 1984; Lafleur *et al.*, 1987; Pereault, 2008) et provoquer un changement dans son comportement, comme c'est le cas pour d'autres espèces (Vinson et Iwantsch 1980; Smith, 1988; Beckage, 2005; Roy *et al.*, 2006). Les effets néfastes des acariens phorétiques ont été démontrés sur certains insectes (Elzinga et Broce, 1988; Rocha *et al.*, 2009; Al-Deeb *et al.*, 2012). L'effet des acariens sur le développement et la métamorphose du CP a déjà été démontré (Smith, 1957; Broersma et Hays, 1966; Amis et Snow, 1985), mais pas sur son comportement (*p.ex.* : sa réponse aux composés volatils). La phorésie (la fixation

temporaire d'un organisme à l'extérieur d'un autre animal pour lui permettre de se disperser) est une méthode de dispersion des acariens comportant de faibles coûts énergétiques pour leurs hôtes (Houck et OConnor, 1991). Elle est très fréquente chez les acariens et a pour conséquence d'augmenter leur capacité à migrer vers de nouveaux environnements et de nouvelles sources de nourriture. Lorsqu'il y a un grand nombre d'acariens présents sur l'hôte, la relation peut cependant devenir antagoniste, et peut diminuer la dispersion des CP (Houck et Cohen, 1995; Al-Deeb *et al.*, 2012).

Détection du CP

Dépistage par battage

Afin de lutter efficacement contre les insectes ravageurs, les techniques de dépistage doivent permettre de détecter l'insecte quand il est dans le verger, et de mieux déterminer les moments précis pour appliquer les insecticides afin de réduire le nombre d'applications et les quantités nécessaires. Différentes méthodes de dépistage ont été proposées, dont le battage des arbres, qui consiste à faire chuter les CP sur une pièce de tissu et sur laquelle ils sont ensuite comptabilisés. L'efficacité du battage est cependant variable et cette technique peut endommager les arbres fruitiers (Wylie, 1951; Le Blanc *et al.*, 1984; Racette *et al.*, 1990).

Dépistage par détection visuelle

La détection visuelle des cicatrices de ponte est une autre méthode utilisée pour déterminer l'abondance du CP dans les vergers. Elle consiste à vérifier la présence de

cicatrices de ponte du CP sur un grand nombre de pommettes, deux à trois fois par semaine, pendant les mois de mai et de juin (Hoyt *et al.*, 1983; Le Blanc *et al.*, 1984; Vincent *et al.*, 1997). La détection visuelle des fruits demeure la seule approche fiable permettant de déterminer le risque pour la culture et la période optimale pour l'application d'insecticides (Vincent *et al.*, 1997). Par contre, cette méthode exige beaucoup de temps et la plupart des pomiculteurs préfèrent effectuer des applications préventives ce qui peut entraîner l'utilisation de grandes quantités d'insecticides (Vincent *et al.*, 1999; Chouinard *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002).

Piégeage

En raison des méthodes mentionnées précédemment (section « Dépistage », « Détection visuelle »), différents types de pièges ont été développés afin de déterminer l'abondance du CP dans les vergers de pommiers (Prokopy *et al.*, 2000; Piñero et Prokopy, 2003) et de fournir un indicateur de risque d'attaque pour la culture. Des pièges pyramidaux appâtés se sont montrés plus efficaces au début de la saison pour capturer les adultes du CP que d'autres types de pièges (Piñero *et al.*, 2001; Leskey et Wright, 2004a; Leskey *et al.*, 2005). L'efficacité des pièges varie en fonction de leur forme, leurs matériaux, leur taille, leur couleur, leur position dans les vergers, et des appâts utilisés. Les captures sont aussi influencées par plusieurs facteurs abiotiques (température, heure du jour, humidité relative, vent, etc.) (Tedders et Wood, 1994; Mulder *et al.*, 1997; Lamothe *et al.*, 2008).

À défaut d'intervention, le CP peut endommager jusqu'à 90% des pommes à la récolte (Vincent et Bostanian, 1988; Chagnon et Payette, 1990; Vincent et Roy, 1992). Malgré cette nuisibilité, aucun piège efficace n'est actuellement disponible pour permettre la détection, l'agrégation et/ou la rétention des adultes du CP dans les cultures fruitières,

que ce soit la première ou deuxième vague d'invasion (Prokopy *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002; Leskey *et al.*, 2010, 2014 – voir Annexe B). Les pièges non appâtés, en dépit de leur capacité à capturer un certain nombre d'adultes et à suggérer des moments pour l'application des insecticides, sont peu efficaces sauf dans les vergers fortement infestés par les CP. La proximité des pommiers diminue l'efficacité des pièges à cause de la compétition et de l'obstruction visuelle, qui rend difficile la localisation de leur silhouette (Prokopy *et al.*, 1999; Leskey et Wright, 2004b). Des pièges appâtés peuvent également être utilisés pour attirer un plus grand nombre de CP mais la compétition cette fois-ci avec les odeurs attractives présentes dans le verger pendant la chute des pétales, diminue l'attrait des appâts et conséquemment des pièges (Leskey et Wright, 2004). Cette situation limite la réduction de l'utilisation d'insecticides dans les vergers (Prokopy *et al.*, 2000; Leskey et Wright, 2004b).

Lutte chimique

Puisque les œufs, les larves, et les nymphes du CP sont protégés dans la pomme ou dans le sol et que les ennemis naturels sont peu nombreux et peu efficaces pour lutter contre les populations du CP (Bobb, 1952; Sawyer, 1987), l'adulte est le stade habituellement ciblé par les interventions. Au Québec et dans l'est de l'Amérique du Nord, la méthode utilisée pour lutter contre les populations du CP dans les vergers a été l'application d'insecticides à large spectre de type organophosphoré. Cependant, des restrictions entamées au niveau règlementaire Canadien et international favorisent maintenant l'utilisation d'autres insecticides, comme les néonicotinoïdes (par exemple Calypso™) (Chouinard *et al.*, 2013) qui sont également des produits à large spectre. Les insecticides sont typiquement appliqués avant que les adultes n'endommagent les pommettes (Chouinard *et al.*, 1992a; Racette *et al.*, 1992; Leskey *et al.*, 2013). Deux à trois applications de l'insecticide sont habituellement nécessaires à chaque année. Une

première application est effectuée sur l'ensemble du verger immédiatement après la chute des pétales, une deuxième est généralement limitée aux endroits où des cicatrices fraîches de ponte ont été notées (par exemple en périphérie du verger) huit à dix jours après la première application et parfois une troisième, de huit à dix jours après la deuxième application (Hagley *et al.*, 1977; Chouinard *et al.*, 1992a; 1998; Vincent *et al.*, 1997). L'application d'insecticides contre le CP est recommandée lorsque les conditions météorologiques favorisent les soirées humides, chaudes et sans vent, entre 18 h et 24 h (Chouinard, 2015). Dans les vergers de pommiers, les pertes potentielles reliées aux insectes ravageurs et aux maladies entraînent l'application de grandes quantités de pesticides chimiques. En 2005, 925 tonnes de ces pesticides étaient employées au Canada, dont 105 tonnes au Québec (11 %) (Statistiques Canada, 2005). L'application des insecticides est parfois réalisée de façon préventive sans égard à la présence ou au niveau de populations des ravageurs (Bessin, 2013). De l'ensemble des insecticides appliqués au Québec contre les insectes ravageurs dans les vergers, 8 % des traitements visaient le CP (Chagnon et Payette, 1990), qui jusqu'à maintenant n'a pas développé de résistance (Vincent *et al.*, 1999).

En plus du développement de la résistance de ravageurs, les risques reliés aux applications multiples d'insecticides sont de plusieurs ordres (Akotsen-Mensah, 2010). En effet, l'usage des pesticides chimiques peut provoquer des effets néfastes sur la santé humaine à travers la consommation de fruits contenant des résidus d'insecticides. Même si les résidus de pesticides se décomposent et ne sont plus présents sur les pommes lorsqu'elles sont achetées, il subsiste un danger pendant l'application de l'insecticide (Hoffmann, 2012). Par exemple les travailleurs œuvrant dans les vergers et les communautés proches des vergers peuvent être affectés par la dérive des insecticides appliqués. Les insecticides peuvent également avoir des effets néfastes sur l'environnement comme : 1) la destruction des espèces bénéfiques tels que les pollinisateurs (*p.ex.* : les abeilles) et les prédateurs ou parasitoïdes de ravageurs (*p.ex.* :

les thrips, les guêpes, etc.) peut affecter ainsi la biodiversité et par conséquent les activités humaines (*p. ex.* l'agriculture) (Santé Canada, 2013); 2) le déclenchement des infestations de ravageurs secondaires peuvent se produire lorsque l'utilisation d'un pesticide réduit la densité d'une espèce de ravageur mais par contre favorise le déclenchement des épidémies d'autres espèces de ravageurs; 3) la contamination des eaux souterraines et de surface peut survenir lorsque que la pluie entraîne les insecticides présents sur les surfaces des plantes et sur le sol (NCEH, 2003); et 4) l'altération de la reproduction et du développement des animaux (et les humains) peut provoquer une élévation du niveau des décès à la naissance ou une réduction du le poids des nouveau-nés (NCEH, 2003).

Les problèmes de l'utilisation des pesticides ne reposent pas seulement sur les grandes quantités employées dans les vergers (Chagnon et Payette, 1990; Chouinard *et al.*, 1998; Statistiques Canada, 2005), mais aussi sur les coûts élevés de leur utilisation, autant pour les producteurs que pour l'environnement. Près du tiers de la superficie totale de la production de pommes au Canada est au Québec, soit 4930 hectares sur un total de 17,000 (Agriculture and Agri-Food Canada, 2014) et l'application des pesticides y engendre des coûts annuels d'environ 1000\$ par hectare (Nature-Action Québec, 2013). Cela revient à environs 4.9 millions de dollars et plus qui sont dépensés en produits phytosanitaires chaque année au Québec. Une étude révèle qu'environ 9,1 millions de dollars par an pourraient être économisés au Canada en terme de pesticides grâce à la mise en œuvre de stratégies de réduction des pesticides utilisés contre les ravageurs comme le CP (MacRae *et al.*, 2006). L'amélioration de cette situation passe par le développement d'alternatives à la lutte chimique (Akotsen-Mensah, 2010).

Lutte biologique et intégrée

Les stratégies de lutte intégrée des ravageurs sont actuellement reconnues comme les moyens les plus appropriés pour lutter contre une grande variété d'organismes nuisibles (Tewari *et al.*, 2014). Ces stratégies sont basées sur le dépistage et la prévention, puis sur l'utilisation des différentes méthodes de lutte (*p. ex.* la lutte biologique qui réduit les effets toxiques des pesticides, et utilise une grande variété d'organismes et de méthodes qui peuvent être combinées afin d'augmenter leur efficacité). Ces méthodes peuvent comprendre des pesticides dérivés de plantes, animaux, champignons, bactéries, virus, protozoaires, nématodes, certains minéraux, des traitements secondaires et des traitements sanitaires (comme la collecte des feuilles et fruits infestés sous les arbres fruitiers sur une base régulière). Souvent, des pesticides chimiques moins toxiques sont utilisés en combinaison avec des agents de lutte biologique. La période d'application de ces nouveaux insecticides à « risque réduit » est plus critique et peut différer de celle des pesticides traditionnels (Agriculture and Agri-Food Canada, 2013).

Plusieurs méthodes de lutte biologique ont été employées contre les coléoptères et notamment les charançons. En ce qui concerne le CP, l'utilisation de parasitoïdes (Racette *et al.*, 1992), de nématodes (Shapiro-Ilan *et al.*, 2008), d'animaux (Koan, 2007), de virus (Reissig *et al.*, 1984), ou de bactéries (Pereault *et al.*, 2009) a été testée et, pour la plupart, avec des résultats prometteurs. Cependant, à ce jour la plupart de ces stratégies a été évaluée individuellement et non pas dans le cadre d'une combinaison de stratégies. La combinaison de différentes stratégies dans le cadre d'un programme de lutte intégrée pourrait s'avérer plus efficace.

Les ennemis naturels du CP connus à ce jour n'ont pas un impact important sur les niveaux de populations de cet insecte dans les vergers (Racette *et al.*, 1992). Parmi ces ennemis figurent des prédateurs (oiseaux, crapauds, carabes, fourmis, araignées, thrips, chrysopes), des parasitoïdes (guêpes, mouches) et des pathogènes (champignons,

bactéries, nématodes). Les animaux tels que les cochons peuvent aussi lutter contre les CP en mangeant les pommes contenant les larves qui tombent au sol (Koan, 2007). Les parasitoïdes des familles des Braconidae (exemple : *Aliolus rufus*) et des Ichneumonidae (*p.ex.* : *Tersiochilus conotracheli*) s'attaquent aussi aux larves du CP (Armstrong, 1958; Racette *et al.*, 1992). Des pratiques sanitaires comme l'enlèvement des feuilles mortes, des mauvaises herbes et des fruits tombés au sol à cause du CP peuvent contribuer à réduire le nombre de sites qui protègent les CP adultes et leurs larves, aidant ainsi au contrôle des populations. Cette dernière pratique a pour effet de diminuer la survie des adultes pour la saison suivante (Horton *et al.*, 2006). Bien que ces méthodes soient prometteuses, la plupart ne sont toujours pas suffisamment efficaces pour contrôler des populations élevées du CP.

D'autre part, la bactérie *Bacillus thuringiensis* (Berliner) *var. eniomocidus* (Bacillales : Bacillaceae) (Lafleur *et al.*, 1987) peut s'attaquer au CP, mais elle est peu efficace contre les adultes (Reissig *et al.*, 1984). Parmi les champignons entomopathogènes, *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Hypocreales : Clavicipitaceae) et *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales : Clavicipitaceae) sont les espèces les plus utilisées (Garman et Zappe, 1929; Pereault, 2008). Malgré des résultats encourageants (McGiffen et Meyer, 1986), le nombre d'applications nécessaires et les coûts sont actuellement trop élevés pour leur utilisation dans les vergers commerciaux (Pereault *et al.*, 2009).

Les nématodes entomopathogènes demeurent une autre alternative pour la lutte biologique. L'application au sol des nématodes du genre *Steinernema* et *Heterorhabditis* peut leur permettre d'attaquer à la fois les adultes et les stades immatures (Shapiro-Ilan *et al.*, 2004a, 2004b; Kim et Alston, 2008). Cela peut toutefois nécessiter de nombreuses applications d'espèces de nématodes différentes, ce qui augmente le coût des traitements (Shapiro-Ilan *et al.*, 2002; Pereault *et al.*, 2009). Des

applications foliaires de nématodes dans la canopée peuvent également être effectuées; cependant les coûts élevés font de cette méthode un outil qui ne peut être utilisé seul (Bélair *et al.*, 1998).

Lutte par écomones

Les écomones (ou composés sémiochimiques) sont des messagers chimiques qui interviennent dans les interactions entre les organismes. Ils offrent un haut degré de spécificité et font en sorte que seul l'insecte ciblé est affecté. Ils peuvent donc être employés pour la surveillance et/ou la suppression des populations de ravageurs.

Il existe aussi des avantages reliés à la réduction des coûts et de la toxicité qui font de l'utilisation des écomones pour la surveillance et le contrôle des ravageurs pour toutes les régions au monde un outil de lutte idéal (Cork *et al.*, 2005). Actuellement, les composés allélochimiques et les phéromones constituent la base des stratégies de lutte intégrée contre de nombreux insectes (Tewari *et al.*, 2014).

Les allélochimiques/allélomones, sont des messagers chimiques sécrétés par une espèce et qui agissent sur une autre espèce (Flint et Doane, 2013). Il peut s'agir de kairomones lorsque le composé est avantageux pour le receveur (par exemple des composés de plantes hôtes qui attirent les insectes pour se nourrir), ou d'allomones lorsque le composé est avantageux pour l'émetteur (*p. ex.* des composés de plantes hôtes qui attirent les insectes pour la pollinisation). Quant aux phéromones (qui agissent seulement entre membres d'une même espèce) des exemples de leur utilisation se retrouvent dans les mécanismes de confusion des mâles, le piégeage en masse, et les

stratégies attracticides (Tewari *et al.*, 2014). Elles sont également couramment utilisées comme appâts pour le dépistage par pièges.

Dans le cadre de la lutte contre le CP, des combinaisons d'odeurs attractives peuvent être employées dans des pièges ou sur des arbres pièges (Leskey *et al.*, 2009, 2010, 2014 – voir annexe B). Ils sont fort utiles pour le piègeage de masse ou la lutte attracticide («attract-and-kill») (Tewari *et al.*, 2014). Des pièges appâtés avec des écomones peuvent aussi être utilisés en combinaison avec des odeurs répulsives, dans le cadre d'une stratégie dite attraction-répulsion (« push-pull ») (Smart *et al.*, 1994; Cook *et al.*, 2007; Reddy et Guerrero, 2010). Ce type de stratégie comprend la combinaison d'une odeur répulsive et d'une odeur attractive utilisées en même temps, pour dissuader l'insecte d'attaquer les arbres (« push ») et l'attirer dans les pièges (« pull ») (Cook *et al.*, 2007). La stratégie attraction-répulsion est parfois utilisée dans les systèmes agricoles pour diminuer l'utilisation d'insecticides chimiques et peut être efficace contre des ravageurs comme le charançon rayé du pois *Sitona lineatus* L. (Smart *et al.*, 1994).

Actuellement les pièges appâtés avec des combinaisons d'écomones sont en mesure de capturer le CP, mais il est difficile d'obtenir une corrélation entre les captures et les dommages à la récolte (Leskey et Wright, 2004b; Piñero *et al.*, 2011). Des arbres-pièges peuvent attirer les adultes (Piñero *et al.*, 2011) mais d'autres moyens doivent être considérés pour gérer les populations après leur arrivée dans les vergers parce que l'efficacité des appâts contenant les écomones diminue rapidement dans les vergers après la nouaison des pommes (Piñero *et al.*, 2001; Leskey et Wright, 2004b; Leskey *et al.*, 2014 – voir annexe B). Très peu d'études ont été faites sur les composés volatils utilisés comme odeurs répulsives visant à repousser les CP des arbres-hôtes vers les pièges.

Odeurs de plantes hôtes

Comme plusieurs autres espèces, les CP utilisent des signaux olfactifs pour localiser les fruits afin de se nourrir, trouver des sites de ponte (Butkewich et Prokopy, 1997; Leskey et Prokopy, 2001), et rencontrer des partenaires sexuels (Eller et Bartelt, 1996). Les adultes possèdent des antennes de type claviforme et genouillé, typique de la famille des Curculionidés. Ces antennes portent des sensilles olfactives leur permettant de détecter les signaux produits par certains composés volatils olfactifs (Alm et Hall, 1986; Leskey *et al.*, 2008). Les composés volatils attractifs identifiés à ce jour pour le CP proviennent pour la plupart de ses hôtes préférés (Leskey *et al.*, 2001; Coombs, 2001; Leskey *et al.*, 2009; Akotsen-Mensah, 2010). Ces extraits contiennent des composés olfactifs tels que le benzaldéhyde (Buchbauer *et al.*, 1993; Piñero et Prokopy, 2003; Akotsen-Mensah, 2010) ou le trans-2-hexénal (Leskey *et al.*, 2001; Prokopy *et al.*, 2001) et peuvent posséder un pouvoir attractif lorsqu'utilisés seul ou en combinaison avec d'autres composés (Prokopy *et al.*, 1995; Leskey et Prokopy, 2000; Leskey *et al.*, 2009). Ils peuvent provenir non seulement des fruits de plantes hôtes, mais aussi d'autres parties des plantes comme les fleurs et les tissus foliaires ou ligneux (Leskey et Prokopy, 2000; Leskey *et al.*, 2005).

L'attractivité du CP aux composés volatils varie selon le cultivar ou l'espèce de plante hôte. Par exemple, le CP préfère les pruniers japonais du type « Formosa » (*Prunus salicina* Lindl. (Rosales : Rosaceae)) et « Santa Rosa » (*P. salicina* Burbank) aux pruniers européens (*P. domestica* Linnaeus (Rosales : Rosaceae)) du type « Stanley » (Leskey et Wright 2007). Selon une étude, le CP préfère les prunes (« Formosa » et « Santa Rosa ») et ensuite les pommes, les pêches, les cerises, et les poires (Leskey et Wright, 2007). La mesure électroantennographique des réponses physiologiques du CP

à des composés olfactifs extraits de ces fruits a permis de déterminer que le cultivar de prune « Stanley », le cultivar de pomme « Empire » (*Malus domestica* Borkhausen (Rosales : Rosaceae), et le cultivar de prune « Formosa » provoquent la plus forte réponse (Leskey *et al.*, 2009), ce qui correspond aux préférences du CP dans les vergers (Leskey *et al.*, 2010).

La phénologie des plantes, étroitement liée au développement de l'insecte (Polavarapu *et al.*, 2004), peut également avoir un effet sur l'attraction du CP envers les composés olfactifs. Ainsi, il a été démontré que des composés volatils émis par les pruniers et des pommiers du début de la floraison et jusqu'à deux semaines après étaient très attractifs pour le CP (Leskey et Prokopy, 2000). Des extraits de prunes et de pommes récoltées quelques semaines après la floraison et la nouaison (Boevé *et al.*, 1996; Leskey *et al.*, 2001; Prokopy *et al.*, 2001), ont aussi montré un pouvoir d'attraction du CP en laboratoire et dans les vergers (Leskey *et al.*, 2001; Prokopy *et al.*, 2001). Ce pouvoir d'attraction est principalement dû à la présence des composés suivants: éthyle isovalérate, limonène, benzaldéhyde, benzyle alcool, décanal, trans-2-hexénal, geranyl propionate et hexyl acétate (Leskey *et al.*, 2001; Prokopy *et al.*, 2001). De tous ces composés, le benzaldéhyde s'est avéré jusqu'à présent le plus attractif, surtout en combinaison avec la phéromone synthétique du CP (Piñero *et al.*, 2001; Piñero et Prokopy, 2003).

Phéromone agrégative

Une phéromone agrégative émise par les mâles vierges du CP a été isolée (Eller et Bartelt, 1996) et nommée acide grandisoïque (AG), ((+)-(1R,2S)-Méthyle-2-(1-méthyléthényl)cyclobutaneacetic acid). Dans la nature, l'AG produit par les mâles est sous la forme de l'énantiomère (+) seulement, mais la version synthétique de l'AG est

racémique : une molécule chirale qui peut contenir l'énantiomère (+) et l'énantiomère (-) en quantités égales. Selon Eller et Bartelt (1996), cette phéromone attire les mâles et les femelles du CP et son rôle est d'augmenter la densité de population des individus à proximité de la source d'émission. Cette phéromone pourrait être utilisée comme signal pour aviser les femelles de la présence d'une source potentielle de nourriture ou d'un site d'accouplement et de ponte. Chez d'autres insectes (*p. ex.* les Scolytinae) cette démarche pourrait servir aussi d'une méthode d'initiation à une attaque massive afin de surmonter les défenses chimiques de la plante-hôte (Landolt, 1997).

L'émission de la phéromone agrégative par des mâles est un phénomène présent chez plusieurs insectes. La majorité des cas connus de ce phénomène sont trouvés chez les coléoptères, chez les Nitidulidae (*p.ex.* *Glischrochilus fasciatus* (Olivier)) et surtout chez les Curculionidae (Jutsun et Gordon, 1989; McCaffery et Wilson, 1990; Landolt, 1997) qui l'utilisent pour attirer des femelles dans le but de s'accoupler (Landolt et Phillips, 1997). Il est possible que les mâles soient attirés par la phéromone d'autres mâles, afin de profiter d'une opportunité d'accouplement avec des femelles à un faible coût en ressources (Landolt et Phillips, 1997; Hodges *et al.*, 2002). La réponse des mâles aux autres mâles peut aussi leur procurer un avantage évolutif en leur permettant de s'accoupler plus facilement ou plus fréquemment (Weldon, 2007). Cela peut être dû au fait que chez les insectes en général, les femelles trouvent plus facilement les mâles regroupés que les mâles solitaires (Otte, 1974; Keitt *et al.*, 2001; Møller et Legendre, 2001; Weldon, 2007). Il est aussi possible que les femelles perdent moins de ressources et puissent plus facilement trouver et choisir le meilleur partenaire sexuel en visitant des mâles regroupés plutôt que des mâles solitaires (Höglund et Alatalo, 1995; Shelly et Whittier, 1997; Aspi et Hoffmann, 1998).

Bien que la phéromone agrégative produite par les mâles du CP attire les deux sexes, la plupart des études sur le sujet ont été jusqu'à maintenant concentrées sur l'attraction

des femelles à des composés testés seuls ou en combinaison avec des composés olfactifs ou avec la phéromone émise par les mâles, probablement parce que les femelles causent la majorité des dommages aux fruits (Lafleur et Hill, 1987; Vincent *et al.*, 1999). En laboratoire, il a par ailleurs été démontré que les femelles étaient plus attirées par l'odeur de cinq mâles que par l'odeur d'un seul (Leskey et Prokopy, 2001). Cela pourrait correspondre à la quantité optimale de la phéromone produite par les mâles pour l'attraction des femelles, une situation similaire à celle que l'on retrouve chez d'autres charançons (Hardee *et al.*, 1974; Hallett *et al.*, 1999).

Bien qu'aucune étude n'ait réussi jusqu'à maintenant à identifier une substance sémiochimique produite par les femelles CP, il est possible que celles-ci produisent aussi des composés attractifs puisqu'il a été démontré que dans certaines conditions, les femelles sont attirées par d'autres femelles (Leskey *et al.*, 1996; Leskey et Prokopy, 2001). Leskey *et al.* (1996) ont aussi rapporté que les femelles CP peuvent être attirées par des extraits provenant du trempage dans l'hexane du corps entier de femelles ou de mâles.

L'âge de l'insecte (Walgenbach *et al.*, 1983; Spurgeon, 2003), son statut sexuel (Ramirez-Lucas *et al.*, 1996; Ruther *et al.*, 2007) et son état nutritionnel (Brennan *et al.*, 1977; Sokolov, 1981) peuvent influencer l'émission ou la réponse du CP à la phéromone. Ces facteurs sont à prendre en considération lors du développement de stratégies efficaces de lutte. Il faut noter que même si la phéromone agrégative est émise par les mâles des deux souches, aucune étude n'a examiné ni comparé la réponse (ou l'émission) des deux souches à la phéromone et aux composés volatils des plantes hôtes (ou à une combinaison des deux). La plupart des études préfèrent se concentrer sur une seule souche.

Selon l'âge de l'insecte, on a observé chez d'autres espèces de charançons, comme le charançon du coton, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), une augmentation de la production de leur phéromone agrégative avec l'âge jusqu'à un certain point (neuf jours) avant une diminution (Spurgeon, 2003). Par contre, la réponse du charançon du maïs, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) et du grand capucin du grain, *Prostephanus truncatus* Horn (Coleoptera: Bostrichidae), diminue avec l'âge après une semaine (Walgenbach *et al.*, 1983; Walgenbach et Burkholder, 1986; Boughton et Fadamiro, 1996). Pour ces raisons, il est important de prendre en considération l'âge du CP, surtout lorsqu'on essaie de déterminer la composition complète de sa phéromone qui est une étape importante dans la lutte contre cet insecte.

L'accouplement peut aussi changer le patron d'émission de la phéromone et le comportement des insectes en réponse à celle-ci. Par exemple, les femelles accouplées du charançon de la canne à sucre, *Metamasius hemipterus* (Linnaeus) (Coleoptera, Curculionidae), sont moins attirées par la phéromone agrégative après l'accouplement qu'avant (Ramirez-Lucas *et al.*, 1996). Par contre, aucune différence n'a été notée dans la réponse des mâles CP aux femelles accouplées ou aux femelles vierges (Leskey et Prokopy, 2001). La réponse des femelles (accouplées ou vierges) aux mâles n'a pas encore été évaluée. Ceci est important car se sont les femelles qui causent le plus de dégâts. Si les femelles accouplées répondent différemment des femelles vierges aux composés volatils, le type d'appât à utiliser dans les pièges pourrait varier en fonction de l'avancement de la saison.

Phéromone synthétique

Il a été possible de synthétiser chimiquement le composé principal (AG) isolé à partir de la phéromone naturelle émise par les mâles vierges (Eller et Bartelt, 1996). Le procédé de synthèse produit un mélange racémique de cette molécule et de son énantiomère (*c.-à-d.* un mélange de 50 : 50 de l'énantiomère (+) et de l'énantiomère (-) de l'AG) qui attire les mâles et les femelles du CP (Eller et Bartelt, 1996; Piñero *et al.*, 2001). L'AG ou ses énantiomères, tel que l'énantiomère (+) dextrogyre de l'AG émis naturellement par les mâles CP (AG(+)), pourraient être utilisés dans les pièges en vue d'augmenter leur pouvoir de capture. En effet, il a été démontré que les pièges pyramidaux appâtés d'AG attirent plus d'adultes que ceux non appâtés (Piñero *et al.*, 2001). Des électroantennogrammes (EAG) réalisés en présence d'AG ont également démontré chez les mâles du CP une réponse au mélange racémique et une augmentation de l'amplitude de la réponse lorsque la proportion de l'AG(-) diminue et que la proportion l'AG(+) augmente dans le mélange (Leskey *et al.*, 2009). Cependant, jusqu'à ce jour, aucune étude comportementale n'a été effectuée sur le CP afin de mesurer l'effet de chacun des énantiomères ou l'effet des divers mélanges et combinaisons des composés volatils synthétiques dérivés de la phéromone par la technique des EAG.

Chez plusieurs espèces de charançons, la phéromone agit en combinaison avec les composés volatils de la plante hôte, ce qui se traduit par une augmentation de l'attraction (Landolt et Phillips, 1997). C'est ce qui se produit également dans le cas du CP (Piñero et Prokopy, 2003; Piñero et Prokopy, 2006; Akotsen-Mensah, 2010). Des études ont démontré que certains composés olfactifs exerçaient un pouvoir attractif sur les adultes, à la fois dans les vergers et en laboratoire (Prokopy *et al.*, 1995; Leskey *et al.*, 1996; Leskey *et al.*, 2001). Ces composés peuvent servir à titre d'appâts dans des pièges utilisés comme moyen de dépistage (Prokopy et Leskey, 1997; Piñero et Prokopy, 2003; Leskey *et al.*, 2005). À titre d'exemple, lorsque l'AG et le benzaldéhyde étaient utilisés ensemble comme appâts dans un piège, les captures du

CP étaient plus élevées que dans les pièges non appâtés ainsi que dans ceux qui contenaient uniquement l'un ou l'autre des deux composés (Piñero *et al.*, 2001, Piñero et Prokopy, 2003). Les appâts peuvent ainsi être constitués d'un mélange de plusieurs substances volatiles attractives. Un appât composé de six différents composants présents dans les plantes hôtes en combinaison avec l'AG a produit une attraction similaire à un appât composé d'AG et benzaldéhyde (Leskey *et al.*, 2005).

Jusqu'à présent, l'attraction produite par l'AG en mélange racémique s'est avérée insuffisante pour qu'il puisse être utilisé comme composé unique d'un appât en vue de dépister les populations du CP dans les vergers commerciaux (Prokopy *et al.*, 2000; Piñero *et al.*, 2001; Leskey *et al.*, 2008). De plus, l'efficacité des pièges appâtés (avec l'AG et/ou d'autres composés volatils synthétiques) diminue rapidement dans les vergers après la nouaison des pommes, probablement à cause de la compétition entre les composés de l'appât et les composés volatils émis naturellement dans l'environnement par les fruits, les fleurs et les tissus du pommier (Prokopy *et al.*, 2003; Leskey et Wright, 2004a, 2004b; Leskey *et al.*, 2008). Cela suggère que les attractifs synthétiques actuels, même en mélange, pourraient ne pas être utilisables dans les vergers commerciaux pour toute la saison (Leskey et Wright, 2004b; Leskey *et al.*, 2009). Aucune étude n'a jamais été réalisée en utilisant l'AG(+) en combinaison avec d'autres composés attractifs des plantes hôtes.

Il manque encore de l'information non seulement importante, mais essentielle sur le CP afin de permettre l'amélioration des stratégies phytosanitaires (Akotsen-Mensah, 2010). Ajoutons que certains comportements du CP (*p. ex.* thanatose, production et émission de la phéromone) rendent difficile l'obtention d'informations pendant les expériences visant à trouver de meilleurs appâts basés sur la phéromone.

Il est possible que la formule complète de la phéromone du CP puisse contenir des composés secondaires comme ceux identifiés chez d'autres espèces de charançons, tel que le charançon du coton *A. grandis* (Tumlinson *et al.*, 1969), le charançon du poivron *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae) (Eller *et al.*, 1994), le charançon de la pacane *Curculio caryae* Horn (Coleoptera: Curculionidae) (Hedin *et al.*, 1997) et l'anthonome du fraisier et du framboisier *Anthonomus rubi* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) (Innocenzi *et al.*, 2001). L'utilisation de l'AG dans des conditions optimales (*c.-à-d.* une concentration dotée d'un plus grand pouvoir attractif, en combinaison avec des composés secondaires, etc.) pourrait ainsi être envisagée pour augmenter l'attraction et l'efficacité des pièges ainsi que leur potentiel à titre de méthode de lutte ou de dépistage (Leskey *et al.*, 2005). À ce jour, aucune étude n'a été effectuée pour déterminer les conditions optimales pour l'émission de la phéromone agrégative. L'analyse de la formule de cette phéromone en serait pourtant simplifiée.

OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

Le but général de cette étude est de caractériser les réponses d'attraction du CP à la phéromone agrégative émise naturellement par les mâles ou la phéromone synthétique ou à d'autres composés olfactifs. Il s'agit également de déterminer les conditions nécessaires à une émission optimale de phéromone par le CP, et de déterminer les facteurs qui peuvent influencer son attraction par cet insecte.

Pour atteindre ces objectifs, nous tenterons de caractériser les effets de plusieurs facteurs abiotiques et biotiques sur le comportement du CP en rapport avec des composés olfactifs. Ceci permettra de déterminer les conditions environnementales optimales (température, humidité, etc.) favorisant l'émission de la phéromone agrégative par le CP mâles, le tout afin de nous permettre d'analyser la phéromone dans

son ensemble. À l'aide d'essais olfactométriques nous pourrions alors déterminer quels sont les composés olfactifs attractifs et répulsifs du CP et les conditions (âge, statut sexuel, etc.) qui entraînent une plus grande attraction à ces composés. L'ajout de composés secondaires de la phéromone naturelle pourrait augmenter le pouvoir attractif de la phéromone synthétique, mais il faut d'abord déterminer si ces composés existent. À cette fin, l'identification des principales périodes d'émission de la phéromone agrégative par les mâles permettrait de prendre en compte le meilleur moment pour effectuer les collectes de phéromone, ce qui en faciliterait l'identification complète. Les composés olfactifs des plantes hôtes pourraient également être utilisés seuls, ou en combinaison avec la phéromone agrégative (s'ils agissent en synergie) en concentration optimale dans les pièges appâtés. Des composés volatils attractifs plus complexes pourraient être décrits plus efficacement grâce aux réponses électrophysiologiques, par exemple pour déterminer la capacité du CP à détecter des différents composés contenant de la phéromone synthétique.

Il convient de noter qu'aucune étude olfactométrique ou électrophysiologique n'a été effectuée ou publiée à ce jour ni sur les deux souches du CP pour comparer les deux énantiomères séparés du mélange racémique de l'AG (ou en combinaison avec des composés des plante-hôtes), ni sur les effets de l'heure et de la photopériode, ou les conditions qui provoquent une meilleure émission de phéromone, ni sur les effets d'acariens sur la réponse comportementale du CP. Afin de rendre possible l'utilisation de la phéromone du CP comme composante de pièges, d'arbres-pièges, d'attracticides et pour le dépistage printanier dans les vergers de pommiers, il conviendrait d'optimiser la réponse des CP à la forme synthétique de la phéromone et à d'autres composés attractifs, permettant l'attraction efficace des souches univoltine et multivoltine. Cela aurait pour conséquence d'améliorer les stratégies de lutte et de réduire de manière significative les applications d'insecticides chimiques en vergers.

Quatre hypothèses générales ont été vérifiées expérimentalement dans le cadre de cette étude. Chacune de ces hypothèses contient de deux à trois prédictions relatives aux expérimentations menées.

Première hypothèse et justification

Certaines conditions physiologiques du CP (*p.ex.* : maturité, état sexuel) peuvent augmenter l'attraction du CP aux composés volatils. Le CP a été en mesure de démontrer un niveau d'attraction variable en fonction des quantités de phéromone émises qui peut être relié au nombre de mâles produisant une quantité optimale de la phéromone (Coffelt et Burkolder, 1972; Prokopy *et al.*, 2004), une situation que l'on retrouve chez d'autres coléoptères (Hallett *et al.*, 1999; Leskey et Prokopy, 2001). L'âge des mâles et le statut sexuel des femelles influencent l'attraction à la phéromone chez certains coléoptères (Ramirez-Lucas *et al.*, 1996; Spurgeon, 2003) et pourrait aussi influencer l'attraction des femelles CP aux mâles (Ruther *et al.*, 2007).

Objectifs et prédictions de cette hypothèse :

I : Préciser le nombre optimal et l'âge des mâles afin d'obtenir la plus forte réponse attractive des femelles. L'attraction des femelles devrait être plus grande en présence d'un nombre élevé de mâles; et les mâles matures attireront plus de femelles que les mâles immature.

2 : Déterminer si le statut sexuel des femelles (vierges/accouplées) entraîne une différence dans la réponse aux composés émis par les mâles. Les femelles vierges seront plus attirées vers les mâles que les femelles accouplées.

Deuxième hypothèse et justification

Puisque les souches univoltine et multivoltine du CP sont incapables de se reproduire ensemble, elles vont répondre différemment aux composés olfactifs (*p.ex.* : la phéromone) pour éviter les pertes d'énergie dues à des accouplements inutiles (Zhang et Pfeiffer, 2008). Ceci a été démontré chez la bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) (Messina et Dickinson, 1993). Les concentrations et les proportions des composés olfactifs de la phéromone émise par les mâles peuvent différer selon les souches. Ainsi, les représentants d'une souche répondront davantage à la phéromone avec les composés en ratio et en concentration spécifique à cette souche et non (ou moins) aux composés de l'autre souche. La réponse des deux souches aux composés volatils des plantes hôtes peut aussi varier selon la distribution (*c.-à-d.* la région et l'intensité de la culture) des fruits dans ces régions (Stearns *et al.*, 1935) dans la mesure où les représentants ont coévolué principalement avec une plante hôte spécifique (Jenkins *et al.*, 2006; Pinzón-Navarro *et al.*, 2010).

Objectif et prédiction pour cette hypothèse

Déterminer si les deux souches du CP répondent de façon similaire à la phéromone émise naturellement par les mâles, à la phéromone synthétique, et aux composés des plantes hôtes (avec ou sans phéromone synthétique ou naturelle). Il ne devrait pas exister une grande différence entre les deux souches quant au nombre des mâles

nécessaire pour attirer les femelles du CP mais il pourrait y avoir une distinction quant à la concentration de la phéromone synthétique nécessaire pour attirer les femelles. Les composés volatils présents dans les plantes hôtes les moins attaquées ou qui n'ont pas coévolué avec la souche devraient être aussi moins attractifs.

Troisième hypothèse et justification

Les conditions biotiques, comme la présence d'autres arthropodes, peuvent diminuer la réponse du CP aux composés olfactifs et les conditions abiotiques (telles que l'humidité, la température, la présence de fruits et d'abris) du milieu déterminent l'émission de la phéromone agrégative par les mâles. Il est probable que les charançons les plus actifs produisent davantage de phéromone lorsque la température et l'humidité sont élevées (Sarai, 1969; Butkewich et Prokopy, 1993; Lan *et al.*, 2004) et qu'ils ne se mettent pas à couvert. De plus, des acariens phorétiques peuvent limiter le mouvement des adultes du CP (Smith, 1957; Broersma et Hays, 1966; Amis et Snow, 1985). Il est donc possible que la réponse du CP aux substances attractives en soit affectée.

Objectifs et prédictions pour cette hypothèse

I: Préciser les conditions abiotiques (température, humidité, etc.) dans lesquelles le CP émet la phéromone. Le CP émettra une plus grande quantité de phéromone agrégative à une température chaude ($> 25^{\circ}\text{C}$) et une humidité élevée ($> 60\%$), et en présence de fruits.

2 : Déterminer si un facteur biotique présent en nature, la phorésie, peut affecter la réponse du CP à certains composés attractifs. Les CP non infectés par des acariens phorétiques vont se déplacer et répondre davantage aux composés volatils que les CP infectés.

Quatrième hypothèse et justification

Les compositions optique et chimique des produits et mélanges (*p. ex.* les deux énantiomères ou le mélange racémique de l'AG, utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres volatils attractifs) détermine la réponse du CP aux composés olfactifs. Les mélanges, qui s'apparentent le plus à la phéromone naturelle ou aux composés volatils des plantes hôtes naturelles, seront plus attirants pour le CP. Différentes concentrations et divers degrés de pureté des produits attractifs peuvent provoquer différentes amplitudes de signal lors de tests électrophysiologiques tel qu'observé chez d'autres espèces d'insectes (Zhuge *et al.*, 2010) comme chez le scarabée japonais *Popillia japonica* Newman (Coleoptera : Scarabaeidae) (Tumlinson *et al.*, 1977; Dickens, 1986). Il est possible que l'AG(+) possède un plus grand pouvoir attractif que le mélange racémique ou l'AG(-) (Leskey *et al.*, 2009). En plus, l'attraction du CP envers des composés volatils peut varier selon le cultivar ou la plante hôte (Leskey et Wright, 2007; Leskey *et al.*, 2010), et les prunes sont préférées à d'autres fruits.

Objectifs et prédictions pour cette hypothèse

1 : Déterminer si différentes concentrations de la phéromone synthétique et de grandisol (un composant de phéromone commun à plusieurs charançons et le précurseur de l'AG) affectent les sensilles olfactives présentes dans les antennes lors des tests

électrophysiologiques. Les sensilles du CP seront capables de détecter les composés volatils de la phéromone synthétique et vont répondre plus fortement à l'AG(+).

2: Identifier l'énantiomère ou le mélange d'énantiomères qui possède le plus grand pouvoir attractif chez les femelles CP ainsi que la concentration et le niveau de pureté à auquel l'énantiomère ou le mélange racémique demeure le plus attractif. L'AG(+) hautement purifié demeurera plus attractif pour les femelles CP que l'AG(–) ou que le mélange racémique. La dose optimale de l'énantiomère de l'AG synthétique, la plus attirante pour les femelles, devrait être faible et près ou égale de la quantité produite naturellement par le CP (1,5 µg par jour selon Eller et Bartelt, 1996).

3: Déterminer lequel des composés volatils de plantes hôtes (*p.ex.* : l'essence de prune, pomme, trans-2-hexénal, benzaldéhyde) a le plus grand pouvoir attractif ou répulsif chez le CP, et si certains de ces composés attractifs agissent en synergie avec la phéromone synthétique ou celle émise naturellement par les mâles CP. Les mélanges de composés olfactifs provenant des fruits de la plante hôte la plus attaquée en milieu naturel, soit celle de la prune, seront plus attractifs que les composés volatils des autres plantes hôtes, et seront plus attirants en présence des mâles du CP ou en présence de la concentration la plus attractive de l'AG(+).

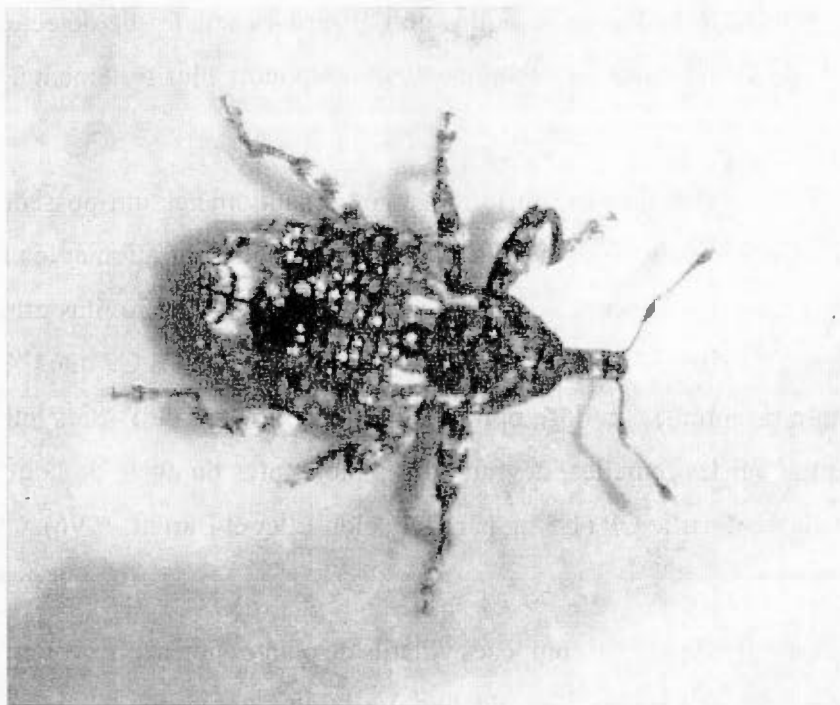


Fig. 1.0 Charançon de la prune *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) adulte (Photo par Virginia Hock).

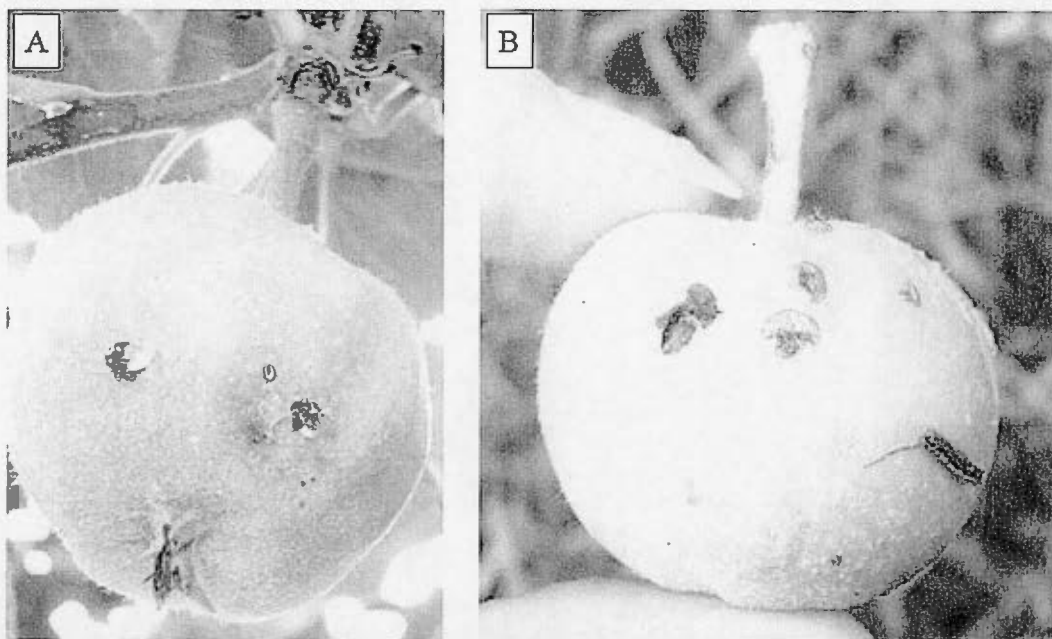


Fig. 2.0 Dommages causés par le charançon de la prune adulte. A) cicatrices d'alimentation; B) cicatrices de ponte (Photos par Virginia Hock).

CHAPITRE I

ESTABLISHING ABIOTIC AND BIOTIC FACTORS NECESSARY FOR RELIABLE MALE PHEROMONE EMISSION AND ATTRACTION TO PHEROMONES BY FEMALE PLUM CURCULIOS *CONOTRACHELUS* *NENUPHAR* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

1.1 Mise en contexte

Le premier chapitre avait pour but d'identifier les facteurs physiologiques (âge, statut d'accouplement) et le nombre de mâles associés au CP qui influencent la réponse des femelles aux mâles. Des tests ont été effectués dans un olfactomètre vertical à deux voies (sans pression d'air) avec des mâles vivants comme émetteurs de la phéromone agrégative et des femelles comme réceptrices des composés olfactifs. De plus, des études sur l'émission de la phéromone agrégative émise par les charançons ont été effectuées selon plusieurs paramètres (types de fruits, taux d'humidité, température, etc.). Finalement, des études électroantennographiques ont été effectuées afin de mesurer les réponses du CP à la phéromone synthétique. Ce chapitre est une version légèrement modifiée, à la demande de l'Université, d'un article originalement publié dans la revue « The Canadian Entomologist » volume 146: 528–547, 2014.

1.2A Résumé

Le charançon de la prune *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) est un important ravageur des fruits à noyau et à pépins en Amérique du Nord. Il existe deux souches de cette espèce : une souche univoltine retrouvée dans la partie nord de son aire de distribution, et une souche multivoltine qui se trouve plus au sud. Ces deux souches ont fait l'objet de notre attention dans cette étude. Bien que l'acide grandisoïque ait été identifié comme une phéromone d'agrégation produite par les mâles de cette espèce, il est probable que d'autres composés secondaires existent comme c'est le cas pour d'autres espèces de curculionidés. Afin d'identifier la présence possible de ces composés additionnels, une bonne compréhension des conditions nécessaires à l'émission et à l'attraction à la phéromone est essentielle pour l'amélioration des techniques de dépistage et de lutte. Le but de cette étude était de mesurer l'effet de facteurs biotiques et abiotiques qui influencent à la fois la réponse à la phéromone et l'émission de phéromone. Des tests ont été effectués dans un olfactomètre vertical (sans courant d'air) à deux voies avec des mâles vivants comme émetteurs de la phéromone d'agrégation et avec des femelles comme réceptrices des odeurs afin de déterminer les facteurs (âge, nombre de mâles ou quantité de phéromone, statut d'accouplement) qui influencent la réponse des femelles aux mâles. Des collectes de phéromone ont été faites sous diverses conditions (débit d'air, fréquence de la collection, humidité, température, strates de collection: haut et bas, présence ou absence d'abris et de fruits, etc.) de même que des études électrophysiologiques (EAG)

en utilisant des mélanges de phéromone synthétique. Pour les deux souches, l'odeur de deux mâles vierges matures a suscité une réponse plus forte et plus constante de la part des femelles vierges matures que les autres âges ou les nombres de mâles. Les collectes de phéromone (expériences « headspace ») ont révélé que les charançons émettent de plus grandes quantités d'acide grandisoïque en conditions de forte humidité et en présence de fruit. Toutes les odeurs de grandlure (une phéromone faite de grandisol, le précurseur de l'acide grandisoïque, et qui est attirante pour d'autres espèces de charançons) testées (I, II, III/IV) et l'énantiomère (+) de l'acide grandisoïque ont provoqué des réponses significatives des charançons par EAG. L'amplitude du signal de l'EAG a également varié selon la concentration des odeurs testées. Ces résultats précisent les conditions physiologiques du charançon pour lesquelles l'attraction à la phéromone est la plus importante, et dans quelles conditions le charançon de la prune produit la plus grande quantité de phéromone. Ils aident aussi à identifier les conditions optimales selon lesquelles la collecte de phéromone doit être effectuée afin d'analyser la phéromone d'agrégation et d'optimiser les outils de lutte contre cet important ravageur de cultures.

MOTS-CLÉS : phéromone d'agrégation, acide grandisoïque, grandlure, EGA, headspace, attractif, répulsif, charançon, odeur, volatil, plante hôte.

1.2B Abstract

The plum curculio *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) is a key pest of stone and pome fruit in North America, with two reproductively incompatible strains. Though grandisoic acid was identified as a male-produced aggregation pheromone for this species, other components likely exist, as is the case in other curculionids. To better determine these components, an understanding of the conditions necessary for optimum pheromone emission and attraction is needed. This is essential to improve monitoring techniques and biological control. The goal of this study was to determine the biotic and abiotic factors influencing both the response to pheromone and pheromone emission of both the univoltine and multivoltine strains. The preference of live females was tested in a dual choice still-air vertical olfactometer using live male plum curculios as odour sources, to determine which factors (age, number of males, mating status) influenced female response to males. Headspace collections of grandisoic acid emission under various conditions (airflow rate and frequency, collection zone strata, variation of humidity, temperature, and presence of harbourage) were also done, as were electroantennograms (EAG) using synthetic pheromone mixtures. For both strains, the odour of two virgin mature males elicited significantly greater and more consistent attraction from mature virgin females than other ages and numbers of males when compared to the control. Emission of grandisoic acid increased under high humidity in the presence of fruit, indicating that these conditions are necessary for optimal pheromone emission and collection. EAG studies

revealed significant responses to grandlure I, II, III/IV and to the (+) enantiomer of grandisoic acid, and the amplitude of the signal varied with concentration. Our data identify the optimal physiological state and conditions at which pheromone collections should be performed, and what physiological life stages respond to these stimuli. These results have strong implications for identifying any possible secondary components of the aggregation pheromone, as well as providing valuable insight in regards to how this insect perceives and reacts to pheromones – both of which are necessary for the development of effective monitoring techniques.

KEY WORDS: Aggregation pheromone, grandisoic acid, grandlure, EAG, headspace, attractants, repellents, weevil, odours, volatiles, host plant.

1.3 Introduction

The plum curculio (PC) *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) is a major pest of pome and stone fruits in North America, capable of damaging 90% of fruit at harvest (Vincent and Roy, 1992). To locate fruit and mates for feeding and reproductive purposes PC use olfactory cues (Butkewich *et al.*, 1987; Eller and Bartelt, 1996; Leskey *et al.*, 2005). Odour of live PC males has been shown to be attractive to both sexes of conspecifics and is attributed to an aggregation pheromone (1*R*,2*S*)-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-cyclobutaneacetic acid, emitted by virgin males of the species, also known as grandisoic acid (GA) (Eller and Bartelt, 1996). Emission of a male-produced aggregation pheromone by PC has been described in other weevil species, notably the boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Tumlinson *et al.*, 1969), the pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (Eller *et al.*, 1994), and the strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi* (Herbst) (Innocenzi *et al.*, 2001), which produce multiple component aggregation pheromones. Many weevils have been found to produce grandisol, a main component of the boll weevil pheromone (Hardee *et al.*, 1974; Armstrong, 2010). Grandisol serves as the major component in the various grandlure pheromone bait mixtures, which are used against a wide variety of weevils (Eller *et al.*, 1994; Hedin *et al.*, 1997; Innocenzi *et al.*, 2001; Cross *et al.*, 2006; Szendrei *et al.*, 2011). It is therefore possible that PC also respond to the grandlure formulations present in these mixtures. Furthermore, although only one component (the (+) enantiomer of GA) has been found for PC thus far (Eller and Bartelt, 1996), in PC

it is likely that such a close-related species also produces a blend of pheromone compounds. While advancements in the development of more attractive pheromone baits for PC have been made (Piñero *et al.*, 2011), the use of pheromones in monitoring PC still requires improvement. Better baits are needed to attract and aggregate PC throughout the season, while limiting damage to non-baited trees (Leskey *et al.*, 2014 – see annexe B). Analysis of behavioural and physiological factors influencing pheromone emission and response has been very useful in developing monitoring and control techniques for other insects (Jutsum and Gordon, 1989; Silverstein, 1990; Neilsen and Jensen, 1993; Smart *et al.*, 1994). Emission of GA may be important throughout the lifetime of male PC. In laboratory studies, PC continue to mate until they die (Johnson and Hays, 1969). Since many factors regarding the aggregation pheromone produced by PC remain unknown, it is important to characterize the behaviour of this insect regarding its naturally produced pheromone component(s). Many factors can affect the response to, and release of, pheromones, as is seen in many other weevil species. For example, individual sex (male / female) has been shown to affect the banana weevil, *Cosmopolites sordidus* (Germar) (De Graaf *et al.*, 2005), where more females were attracted to pheromones than males. The amount of pheromone determines in part the response of the cigarette beetle *Lasiderma serricorne* (Fabricius) (Kuwahara *et al.*, 1977) and the boll weevil (Hardee *et al.*, 1974), with males responding to a concentration range, above or below which the insect is either not attracted, or in some cases is even repulsed by the pheromone. Age of the emitter also influences the response of the boll weevil (Spurgeon, 2003) with pheromones

being produced in larger quantities in younger insects; and mated status affects the rice weevil *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Phillips and Burkholder, 1981), with mated males being less attractive than virgin males. The analysis of pheromone components along with studies on weevil behaviour and attraction to aggregation pheromones have resulted in advances in pest management strategies, with the boll weevil serving as a prime example (Tumlinson *et al.*, 1969; Dickerson *et al.*, 1987; Spurgeon, 2003). More complete analysis of the PC aggregation pheromone could improve control methods for PC as well.

The goal of this study was to characterize the olfactory response of PC to the natural odours emitted by males (Eller and Bartelt, 1996). In addition, we also determined the conditions resulting in optimum pheromone emission as well as evaluated electroantennogram (EAG) responses to pheromone stimuli and related compounds. We used bioassays as well as headspace collections and EAGs to characterize pheromone production and female response. Bioassay experiments were designed to determine: 1) the quantity of males needed to elicit a maximum attractive response from females. In other words, the optimal amount of pheromone emitted by males. 2) the age of males that was the most attractive to females, since mature males may emit more pheromone, while immature males may not emit any. 3) the effect of responder mating status, because mated females may respond less to males than virgin females. 4) the effect of strain, since different strains may display different responses, for example in quantity of males found attractive (which could be related to pheromone

emitted). Headspace collections were aimed at identifying 5) abiotic and biotic conditions resulting in consistent GA emission, because increasing parameters like temperature and humidity may increase emission; and EAGs were conducted in order to determine 6) if PCs responded electrophysiologically to GA as well as to grandlure components, since in order to have a behavioural response to these synthetic volatiles, PC must first be able to detect these compounds and differentiate between concentrations.

We expected female attraction to live males to be greatest between two and eight mature males (Leskey and Prokopy, 2001). We also predicted that virgin and mated females would exhibit a similar attraction to males (Akotsen-Mensah, 2010). Based on their reproductive behaviour (Johnson and Hays, 1969; Smith, 1957; Smith and Salkeld, 1964), it is likely that mature males will be more attractive to females than immature or old males. High humidity and temperatures in the presence of suitable fruit should also elicit a good pheromone emission (Garman and Zappe, 1929; Smith and Flessel, 1968; Butkewich and Prokopy, 1993). It is likely that PC respond to low doses of GA (Leskey and Prokopy 2001; Prokopy *et al.*, 2004, Leskey *et al.*, 2014 – see Annexe B) and to mixtures that contain greater amounts of the (+) enantiomer (Eller and Bartelt, 1996). There are two strains of this insect, a univoltine northern one and a multivoltine southern one (Racette *et al.*, 1992), which are reproductively incompatible (Padula and Smith, 1971; Zhang and Pfeiffer, 2008; Zhang *et al.*, 2010). In order to avoid fruitless interstrain mating (Padula and Smith, 1971; Zhang and Pfeiffer, 2008;

Zhang *et al.*, 2010), the two strains may respond differently to odours of conspecifics and pheromones, but we expect that both strains will respond to the same type of odours (*i.e.* both strains will be able to detect GA and respond to conspecifics).

1.4 Materials and Methods

1.4.1 Bioassays

Univoltine PC were obtained from infested apples (*Malus* sp.) collected in late June early July 2009 from unsprayed biological orchards in Saint-Bruno-de-Montarville, Québec, Canada (45.55028°N, 73.31917°W) and kept in emergence cages. Emerging adults were collected daily and immediately separated by sex (Thompson, 1932), transferred to overwintering cages (Le Blanc, 1992), and then placed under natural conditions throughout winter. Overwintered adults were removed from the cages the following spring and placed in 2 L plastic containers with small apples and water (wetted cotton dental wick). The containers were placed in environmental control chambers at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% R.H., and 16L:8D to mimic optimal summer conditions (Amis and Snow, 1985). We kept a perpetual laboratory population as per Hoffmann *et al.* (2007) which was augmented annually with more wild individuals.

Trials with multivoltine curculios were taken from a laboratory population established at the Appalachian Fruit Research Station (Kearneysville, WV) in 2001 and augmented annually with wild individuals, as per Leskey *et al.* (2010). Adults were reared in the laboratory at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 14L:10D photoperiod on a diet of green thinning apples and water based on the methods of Amis and Snow (1985). Newly emerged adults were held in mixed-sex groups of 100 individuals, and were allowed to mate and lay eggs in thinning apples. Larvae emerging from apples were placed in 500 mL jars containing soil and shipped to the Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA; St-Hyacinthe, Quebec, Canada). Jars containing the multivoltine pupae were placed in environmental control chambers at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% R.H. (16L:8D). Emerging adults were collected daily, separated by sex and held under the same conditions as the univoltine strain.

All female PC used as 'test PC' in experiments were sexually mature (*i.e.* two - three weeks old), as were all male PC used as odour sources with the exception of the experiment in which immature males (less than two weeks old), mature males (two - three weeks old), and old males (three - four weeks old) were tested as odour sources. Jars containing males were prepared in advance to allow males to acclimatize to their settings. Males were held under the same environmental conditions as the females being tested (*i.e.* $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and 70% R.H.) and each group of males was used only once.

Females were randomly sampled from all trials in order to confirm maturity and sexual status. Though there was little chance of females from the virgin modality being mated, these females were also dissected in order to validate results. In the experiment where 'virgin vs. mated' females were used, females from the 'mated' modality were held with males for two weeks prior to experiments to allow for mating (Leskey *et al.*, 2010). Females in the 'mated vs. virgin' experiment were dissected at the end of the experiment to verify their maturity and sexual status. Females were placed in 70% ethanol at 4°C (Hoffmann *et al.*, 2004) until dissected. Dissections were done as per Hoffmann *et al.* (2004), by examining the state of oocytes and the spermatheca. All dissected 'mated' females were mature, containing sperm in their spermatheca, while all 'virgin' females were mature but without sperm in their spermatheca.

The olfactometer used consisted of a large (inner Ø = 105 mm, 50 mm in height) round Pyrex® glass container (Corning Inc., Corning, New York, USA). Two lateral openings on the apex (inner Ø = 24 mm, 60 mm height) were the connectors (left and right) for the odour jars while a central apical opening (inner Ø = 24 mm, 60 mm height) was the site where PC were introduced into the arena. Each 500 mL Mason™ 'odour jar' (Bernardin LTD., Richmond Hill, On., Canada) contained either male PC (test odour) or air only (control odour) (Tinzaara *et al.*, 2007). We used Standard nylon mosquito screening to cover the lateral two openings of the olfactometer as well as the Mason jars in order to prevent females from escaping and reaching the odour source.

We used Parafilm®M (Sigma-Aldrich Canada Ltd. Oakville On., Canada) to secure the inverted Mason jars to the olfactometer.

We conducted tests in an observation room held at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and 70% R.H. (Smith and Flessel, 1968; Racette *et al.*, 1991; Chouinard *et al.*, 1993). A red filter (LEE Filter, red primary no. 106®, Son-Art Production, Saint-Hyacinthe, Qc, Canada) that allows only wavelengths of 630-800 to pass was used to cover a neon light (40W); the sole source of light during experiments since PC are not perturbed by red light (Prokopy *et al.*, 1995). At the beginning of each trial one female was introduced into the olfactometer and left for 30 min, after which its final position was noted and the female removed; only insects found within a radius of 10 mm or within the tubes leading to the odour jars (*e.g.* test or control odour zones) were used for statistical analysis; other positions were considered as no choice having been made and were disregarded (average of 25%) as is commonly done in olfactometric trials (Tinzaara *et al.*, 2007; Altuzar *et al.*, 2007; Akotsen-Mensah, 2010). The reason for this is the thanatose behaviour of PC (Garman and Zappe, 1929; Wigglesworth, 1953), which often leaves a percentage of them immobile on the bottom of the olfactometer for long periods of time after handling. This can sometimes occur no matter what measures are taken to reduce handling time and stress to the insect, or how much time is allowed for the insect to acclimatize to its environment. Each female was considered one replicate, and odour zones were randomized and replaced after each replicate. The average number of replicates was 17, however occasionally replicate number was higher or lower than the average (range

of 9-29). This is because there were occasional deaths of PC during rearing within the selected age groups, and because not all PC responded during trials. Odours tested were virgin males of different ages (immature males = less than two weeks old, mature males = two - three weeks old, and old males = three - four weeks old) and of different quantities. Since two males emit the most attractive odour for both strains of PC, we used this quantity as an odour source for the remaining experiments.

1.4.2 Headspace collections

We conducted headspace collections using multivoltine PC, since the tests were conducted at the USDA-ARS (Kearneysville, WV, USA) during the winter months of January to March, when no wild univoltine PC were available due to diapause. Also, shipping lab-reared PC over long distances, particularly during the winter, usually results in loss of large numbers of PC by the time of arrival at the destination (personal observations).

For the constant vs. random flow rate experiment, we used four day old virgin multivoltine males and collections were done every four days for a duration of 36 days. For all other experiments, male PC were 15 days old and collections were collected daily for five days. There were three replicate jars (with eight males each) for each modality.

We collected headspace volatiles from eight multivoltine virgin males introduced into six 1 L, four-necked glass containers (Fig. 1.1A and 1.1B) and provided with eight green thinning apples, except in the 'Plum' experiment where either eight 'Stanley' plums (in the three test jars) or nothing (in the three control jars) was given. This is because we wanted to test the emission of pheromone when PC were in the presence of their most preferred fruit, plums generally being preferred over apples (Leskey and Wright, 2007; Leskey *et al.*, 2010). Air was drawn into the container through 6-14 mesh activated charcoal (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), and out of the container through a trap (150 mm x 15 mm outer Ø) containing Super Q (0.200 g each; Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL) by vacuum (approximately 1 L/min per collection tube x two tubes per container). We aerated volatiles continuously for 24 h at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and 14L:10D photoperiod. Volatile collections from each of the two sample tubes per container were eluted daily with 2 mL dichloromethane (DCM) and immediately stored in a freezer at -30°C . Each sample tube was subsequently rinsed with an additional 4 mL of DCM.

We analysed samples using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Electronic impact (EI) GC-MS was conducted on a HP 6890 GC coupled to a HP 5973 Mass Selective Detector using a DB-WAXETR capillary column (60,000 mm x 0.25 mm ID, 0.25 mm film-thickness, J&W Scientific Inc., Folsom, CA). Oven temperature was set at 50°C for 2 min, then programmed to 230°C at $15^\circ\text{C}/\text{min}$ and held for 15 min.

A 70 eV electron beam was employed for sample ionization and helium was used as carrier gas.

We manipulated the conditions associated with three of the six collection jars while we held the other three collection jars under standard (control) conditions. Controls included eight virgin male PC with eight apples and water (wetted cotton wicks) held at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ at 75% R.H., no harbourage (*i.e.* no cover provided), standard position for collection tubes, and continuous collections at the normal flow rate of 1 L/min (for each tube). Experimental conditions evaluated included: random vs. constant airflow, flow rate (0.5 L/min vs. 1 L/min), collection tube strata/position (low vs. standard), humidity (15% vs. 75%, and 25% vs. 75%), temperature / humidity combination (20°C at 25% R.H. vs. 30°C at 75% R.H.), and harbourage inclusion (folded filter paper vs. no folded filter paper) (Table 1.1). All of the above were tested in order to determine if altering these factors improved pheromone emission. For example, it has been shown that PC increase activity, movement, and oviposition at higher levels of R.H. (Le Blanc *et al.*, 1984; Racette *et al.*, 1991; Chouinard *et al.*, 1994; Prokopy and Wright, 1997) and warmer temperatures. Low temperatures ($\leq 6^\circ\text{C}$) arrest development (Sarai, 1969; Piñero and Prokopy, 2004), and temperatures between $15\text{--}19^\circ\text{C}$ tend to immobilize or reduce PC movement, while temperatures between $20\text{--}30^\circ\text{C}$ result in increased PC activity and flight (Chouinard *et al.*, 1993; Dixon *et al.*, 1999; Leskey and Prokopy, 2002). It is possible that an increase in activity may be related to an increase in pheromone emission. We tested different levels of humidity on their own, and also in

different combinations of both temperature and humidity, allowing for a comparison between the two treatments. Both temperature and humidity have strong influences on PC behaviour and survival, and can rarely be interpreted independently from one another in nature (Leskey and Prokopy, 2002; Lan *et al.*, 2004; Piñero and Prokopy, 2004). High temperatures and low humidity conditions may negatively affect PC behaviour and survival, while high temperature and high humidity levels are known to increase PC activity (Mulder *et al.*, 1997) as well as trap captures (Lamothe *et al.*, 2008).

As the level of the collection tubes may affect the amount of GA collected (with lower tubes perhaps collecting pheromone at a higher concentrations), one set of tubes in the experimental treatments was placed in the lower third of the jar, while the other remained at the normal setting (*i.e.* upper third of the jar).

1.4.3 EAG trials.

We conducted EAG trials at the USDA-ARS (Kearneysville, WV, USA) since the equipment for conducting EAG trials of PC was only available at the USDA. We used only fed, sexually mature multivoltine females aged 14-21 days in EAG trials (Leskey *et al.*, 2010). There were four replicates per female, with seven females in the high dose

modality, and six females for the low dose modality and also for the trials comparing GA.

We used two odour standards: the synthetic volatile trans-2-hexenal (T2H), and volatiles collected from 'Stanley' plum (at 21 mm fruit) which was previously found to be highly stimulating (Leskey *et al.*, 2009, 2010). The 'Stanley' plum standard was produced according to the methods described in Leskey *et al.* (2010). We also tested three different lures containing grandisol (from which GA is made) obtained from ChemTica (San Jose, Costa Rica). These lures were: grandlure I: (*cis*)-1-methyl-2-(1-methylethenyl)cyclobutaneethanol, grandlure II: (Z)-2-(3,3-dimethylcyclohexylidene)ethanol, and grandlure III/IV: (Z)-(3,3-dimethylcyclohexylidene)acetaldehyde/(E)-(3,3-dimethylcyclohexylidene)acetaldehyde. We also used the (+) enantiomer of grandisoic acid ((+)-GA) and the racemic mixture of grandisoic acid ((±)-GA), all coupled with a dichloromethane (DCM) solvent, which also served as the control. The (±)-GA contains equal amounts of the (+) and (−) enantiomers (50:50), while (+)-GA contains 71% (+)-GA. The (+)-GA was made from (±)-GA which was obtained from grandisol through oxidation performed at University of Quebec at Chicoutimi, Qc., Canada. We evaluated synthetic volatiles at two concentrations: 0.010 and 0.001 g/mL.

We prepared GA by sequential oxidation of grandisol, the active ingredient of commercial grandlure (Bedoukian Research, Danbury, CT, USA). N-

methylmorpholine (NMO, 3.40 g, 29.0 mmol) was added to a dried solution of 2.24 g of grandisol (14.5 mmol) in methylene chloride (CH_2Cl_2 , 25 mL). The mixture was chilled with ice water, after which the catalytic amount of tetrapropylammonium perruthenate (TPAP, 0.255 g, 0.726 mmol) was added to a dried solution of grandisol (CH_2Cl_2). The mixture was stirred for 1 h at room temperature or until the reaction was complete, as shown by using thin-layer chromatography (TLC). The solution was evaporated under reduced pressure to give a black oily residue.

The second oxidation step was conducted by dissolving crude grandisol in a mixture of t-butanol (30 mL), water (5 mL) and 2-methyl-2-butene (31 mL). The mixture was chilled to 0°C . An aqueous solution (20 mL) containing sodium chlorite (2.36 g, 26.1 mmol) and monosodium phosphate (3.80 g, 27.6 mmol) was added drop-wise over a period of 10 min. The mixture was vigorously agitated for a period of 30 min. Work-up was performed by evaporating the solvent and adding 50 mL of NaOH_2N . The mixture was washed with CH_2Cl_2 (four \times 50 mL). The aqueous phase was acidified with aq. HCl 10% to pH four. The product was extracted with CH_2Cl_2 (five \times 50 mL) and dried with MgSO_4 . Evaporation afforded 1.90 g of (\pm)GA (78.0% yield).

Enantiomeric purification was performed by co-crystallisation of GA; 1 g of GA was dissolved in hot ethanol-water mixture (50:50) and 0.965 g of quinine was added. The solution was allowed to chill in a cold room (-18°C) for 24 h. The crystals obtained were filtered and re-crystallized three other times in a hot ethanol-water mixture

(50:50). The mother liquors were combined each time. After four re-crystallization steps, the solid was dissolved in CH_2Cl_2 and the (–) enantiomer of GA was extracted with NaHCO_3 . The aqueous layer was washed with CH_2Cl_2 and neutralized with aq. HCl 10% which precipitates GA. The latter was extracted with CH_2Cl_2 , dried with MgSO_4 and evaporated under reduced pressure. The mixture was acidified with aq. HCl 10% and GA was extracted with CH_2Cl_2 . The organic phase was washed with aq. HCl 10%, dried with MgSO_4 and evaporated under reduced pressure.

Subject PC females were immobilized in a custom polycarbonate insect holder (Leskey *et al.*, 2009, 2010). The indifferent electrode was filled with a diluted reference electrode solution (diluted from 4.0 M KCl-saturated AgCl to 0.4 M). The electrode was then inserted through a port in the top of the insect holder through the exposed membrane attached to the ventral cervical sclerite between the thorax and the head. The recording electrode was similarly filled with electrode solution and inserted through a port at the rear of the holder into the mid-point (between segments two and three) of the immobilized four-segmented antennal club. This region of the antenna has the highest concentration of potential olfactory receptors (Alm and Hall, 1986). The insect holder was then nested into a secondary polycarbonate slide-frame (10 mm width x 6.0 mm height x 110 mm length) to permit insertion of polished tungsten electrodes ($\varnothing = 0.2$ mm x 140 mm length) into the filled glass electrodes.

Baseline output signal from antennae of PC was allowed to stabilize for 10 min. PC exhibiting output baseline variation (noise) greater than ± 25 mV were not tested (10% of those mounted). After baseline stabilization, the insect holder was inserted into a cylindrical port ($\varnothing = 16$ mm) at the terminus of a moving air stream, and clean air was passed across the recorded antenna at 1 L/min. A stimulus cartridge was prepared for each odour stimulus. In brief, 0.05 mL solution from the 8 mL parent extract was dispensed onto a filter paper strip (Whatman Grade three filter paper, 75 mm x 6 mm, Whatman Inc., Piscataway, NJ). After evaporation, the strip was loaded into a glass Pasteur pipette and mounted on a 10 mL syringe. A rotation of 2 mL puffs of each tested stimulus was injected by hand into the clean air stream through an orifice 150 mm upwind from the antenna at a 30 second interval. Four replicates were performed per insect, yielding a 12 min total trial time for each responder. A total of seven females were evaluated for responses to each of the high doses of stimuli while six females were evaluated for responses to the low dose and GA trials, respectively.

Input signals were amplified and received by a USB-1608FS data acquisition unit (Measurement Computing Corporation, Norton, MA). Signals were passed to a computer-based analytical program (DasyLab 9.0, Dasytec USA, Amherst, NH) for interpretation and recording of output. Output samples were taken and recorded at a rate of 31 samples per second.

1.4.4 Statistical analysis.

We used SPSS statistical software (SPSS Inc., 2006, Chicago, Illinois) to analyze all data. For Bioassays, the number of PC choosing test vs. control odours was analyzed using a two-tailed χ^2 test ($P = 0.05$), and a Yates continuity correction was applied when necessary (Siegel and Castellan, 1988). The results of these experiments were further analyzed also using a two-tailed χ^2 test ($P = 0.05$), for example, when comparing responses obtained from different experiments or between strains (*e.g.* the number of univoltine mated or virgin female responders to test odours vs. multivoltine mated or virgin female responders to test odours; or univoltine female response to the odours of different ages of males vs. multivoltine female response to different ages of males; or univoltine female responses to different numbers of males vs. multivoltine female responses to different numbers of males). For headspace collection experiments, each trial /modality was analyzed by performing a Wald's statistic logistic regression ($P = 0.05$) to determine if any of the manipulations influenced pheromone emission. For EAG, the response data from each individual were analyzed using the GLM procedure for mixed models to construct ANOVA tables for mean amplitude of response (mV) among all individuals evaluated. The EAG sensitivity model evaluated the effect of odour stimulus with replicate used as a blocking factor. When the GLM indicated significant differences between multiple odours, multiple comparisons were calculated using Tukey's HSD ($P = 0.05$).

1.5 Results

1.5.1 Bioassays

For (virgin) univoltine PC and multivoltine PC, significantly more females responded to two males compared to the control (univoltine: $\chi^2=9.941$, $df=1$, $P=0.002$; multivoltine: $\chi^2=4.172$, $df=1$, $P=0.041$) (Fig. 1.2). Results for the response of (virgin) females to one male (univoltine: $\chi^2=0.692$, $df=1$, $P=0.405$; multivoltine: $\chi^2=0.043$, $df=1$, $P=0.835$), and five males (univoltine: $\chi^2=1.333$, $df=1$, $P=0.248$) vs. the control revealed no significant attractive response. There was however a significant repulsion for multivoltine females towards the five male modality ($\chi^2=5.400$, $df=1$, $P=0.020$).

Experiments with male emitters of different ages revealed that for univoltine PC, only mature males were significantly attractive ($\chi^2=14.727$, $df=1$, $P<0.001$) vs. the control (Fig. 1.3). For multivoltine PC, there was no significant difference for any of the modalities (Fig. 1.2) when compared with the controls (immature males: $\chi^2=1.800$, $df=1$, $P=0.180$; mature males: $\chi^2=1.316$, $df=1$, $P=0.251$, old males: $\chi^2=1.143$, $df=1$, $P=0.285$) (Fig. 1.3).

Regarding mated vs. virgin female response to two males, only virgin females of both strains were significantly attracted to two males (univoltine: $\chi^2=4.000$, $df=1$, $P=0.045$;

multivoltine: $\chi^2=4.455$, $df=1$, $P=0.035$). There was no significant difference between mated female response to two males ($\chi^2=2.250$, $df=1$, $P=0.134$) ($\chi^2=2.579$, $df=1$, $P=0.108$) compared with the control respectively for univoltine or multivoltine strains. (Fig. 1.4). No significant differences were found between mated vs. virgin females for either strain, nor between strains for any of the modalities tested.

1.5.2 Headspace

For random airflow flow jars, by the eighth day small amounts of GA were detected, prior to this date no GA was observed (Fig. 1.5). By day 12-16 the amount of GA detected had increased. From days 20 to 32 the amount of GA was decreasing, though there was a slight increase in GA again on day 36. Nothing was detected by day 40. For constant airflow jars, GA was detected on day 12. After day 16 no detectable amounts of GA were observed, however airflow did not significantly affect GA emission (Table 1.2). Collections taken from both low (0.5 L/min) and high (1 L/min) flow rates showed the presence of GA. The highest GA peak was found in the high flow rate trial (Table 1.1). However, changes in flow rate did not significantly improve GA emission (Table 1.2). Collections taken from both high and low strata (at the standard 1 L/min flow rate) have shown that GA was present in both strata but that the highest acid peak of GA was collected from the high strata tubes (Table 1.1). Strata position did not significantly influence GA emission (Table 1.2). Collections taken at

high (75%) and low (15%) humidity show that GA was emitted at both humidities with all canisters showing GA emission, and the highest GA peak being found in the high humidity modality (Table 1.1). When comparing the 25% humidity to the 75% humidity, the majority of GA was again found from the high humidity jars, while only one low humidity jar was found to emit GA. The highest peak was again from the high humidity modality. Humidity was found to significantly affect GA emission in the trial comparing 25% to 75% R.H. (Table 1.2). Both high temperature / humidity (30°C + 75% R.H.) and low temperature / humidity (20°C + 25% R.H) modalities showed GA emission. Though the low temperature / humidity jars had the highest GA peak, the high temperature / humidity jars modalities emitted GA more consistently with GA being emitted in most of the high temperature / humidity jars (Table 1.1). However, no significant influence of the temperature / humidity combination on GA emission was found (Table 1.2).

The majority of GA was emitted from jars in the plum modality, including the highest GA peak. In fact, of all the headspace experiments this modality produced the greatest GA peak. The modality with no plums showed some GA emission, but this amount was very minute (Table 1.1). Plums were found to significantly influence the amount of GA emitted (Table 1.2). Both refuge and control jars showed GA emission, but the highest peak was from the control (no refuge) modality (Table 1.1), and harbourage was found to significantly negatively affect GA emission (Table 1.2).

1.5.3 EAG trials

Significant differences were found between solutions when presented at the high (0.010 mg/mL) dose ($F=48.158$, $df=5$, $P<0.001$). All solutions differed significantly from the DCM control and the T2H standard ($P<0.001$), with T2H eliciting the greatest response. The responses to solutions with GA (*i.e.* (+)GA, grandlure I, grandlure II, grandlure III/IV) did not differ significantly from each other (Table 1.3). When the low dose (0.001 g/mL) was tested, a significant difference was found between test odours ($F=360.843$ $df=5$, $P<0.001$). Only grandlure I and grandlure III/IV differed significantly from the control (Table 1.3). Grandlure II did not differ significantly from (+)GA ($P=0.566$), but differed from grandlure I ($P=0.031$) and grandlure III/IV ($P<0.001$).

When comparing only the synthetic pheromone volatiles ((+)GA at 0.010 g/mL and 0.001 g/mL, and (\pm)GA at 0.010 g/mL) along with T2H (0.010 g/mL) and a 'Stanley' plum standard, a significant difference was observed between volatiles tested ($F=315.381$, $df=5$, $P<0.001$). All volatiles differed significantly from the control ($P<0.001$). The GA-containing volatiles did not differ significantly from each other, but they differed significantly from both T2H ($P<0.001$) and the 'Stanley' plum standard ($P<0.001$), the latter two producing much stronger EAGs (Table 1.3). In all

experiments where they were used, T2H and the 'Stanley' plum standard always elicited the highest responses, which were always significantly greater than the control DCM.

1.6 Discussion

1.6.1 Bioassays

Results were generally similar for both strains of PC and revealed that a group of two males seem to emit the most attractive odour. The amount of odour emitted by a single male was not attractive to either strain of female PC, a result that supports the findings of Leskey and Prokopy (2001), who found that PC females were equally attracted to the odour of a single male and the control. The difference in preference between different group sizes of males indicates a concentration or dose effect regarding odour. This is similar to what is seen in various other insects regarding pheromone response, including the cigarette beetle (Coffelt and Burkolder, 1972), boll weevil (Hardee *et al.*, 1974), and the Asian palm weevil (Hallett *et al.*, 1999). Males in groups may have a greater chance of breeding with females than solitary males (Weldon, 2007). Furthermore, females may only visit the largest perceived stimulus (Otte, 1974) *e.g.* the largest group of males; therefore isolated males may not provide an adequate stimulus for female visitation and mating (Keitt *et al.*, 2001; Møller and Legendre,

2001). Attraction of females to groups of males may also be attributed to the possibility of females benefiting from reduced search costs (Höglund and Alatalo, 1995; Shelly and Whittier, 1997). When searching for fit males there may be an advantage of being able to compare different males at once because males are present in clusters instead of widely dispersed (Höglund and Alatalo, 1995; Shelly and Whittier, 1997; Aspi and Hoffmann, 1998). However, in regards to PC it appears there is a limit to the number of males in a cluster that will be attractive to females. Two males are attractive to females at close range, as would be the case when both females and males have already migrated into orchards. However, under certain field conditions a stronger stimulus (larger cluster of males) may be needed to attract females from farther away (*i.e.* females not yet in orchards but rather emerging from overwintering sites in neighbouring woodlots) (Leskey *et al.*, 2001; Akotsen-Mensah, 2010). In both strains females were attracted to two virgin males; however five males were found to be repulsive only to the multivoltine strain in the current study, perhaps because the amount of pheromone emitted was above the 'attractive' threshold for the multivoltine strain. There may be a slight difference between strains in the way that PC respond to or emit odours. This may be due to the fact that the two strains cannot intermate successfully (Padula and Smith, 1971; Zhang and Pfeiffer, 2008; Zhang *et al.*, 2010) because of differences in genetics and *Wolbachia* infections (an infectious bacteria that can affect mating) (Zhang and Pfeiffer, 2008), so it would be advantageous to avoid interstrain matings by having different responses to, or emission of, odours or pheromones (*i.e.* differences in quantity / ratio of aggregation pheromones). In general

however, some degree of similarity in response of PC strains to odours is expected, given that both strains have been shown to produce and respond to GA (Eller and Bartelt 1996). This is an advantage when using pheromones as attractants for trapping / monitoring, since both virgin and mated females of both strains should be attracted to the bait. Similar responses between strains would simplify matters in terms of development of pest management strategies.

In general, for both strains mature virgin males were the most attractive to females. This indicates that males may need to be sexually mature to attract females. Male PC emerge from hibernation and migrate into orchards prior to the emergence of females, indicated by the higher ratio of males captured early in the season compared to females (Smith and Flessel, 1968). Males can also mate with immature females (Johnson and Hays, 1969). It is possible that by the time females reach orchards where males are present, males may already be mature. Attraction may be linked to increased or optimum pheromone emission by mature males. Pheromones are emitted as early as eight days, peaking between 12 and 20 days. This may correspond to mating and oviposition since lab-reared males can produce mature sperm as early as six days after pupal eclosion, and females can mate as early as five days old, and are capable of laying eggs at eight days post eclosion, (Johnson and Hays, 1969). However, the number of matings increases as both sexes increase in age, with the majority of mating taking place between 16-20 days of age (Johnson and Hays, 1969). In the wild, PC may take an average of 13 days to mature (Smith and Salkeld, 1964). Therefore young males are

not attractive to females because they may not be producing any or enough pheromone prior to two weeks of age. Old males are less attractive possibly due to little or no pheromone emission; our headspace results indicated very little GA emitted during the three-four week period. Male aggregation pheromone emission increased with age reaching a peak at nine days in the boll weevil (Spurgeon, 2003). Female lekking sandflies, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva), have also been shown to choose middle-aged males over older males (Jones *et al.*, 2000).

While virgin females are attracted to virgin males, the response was not significant for mated females. Mated status has sometimes been found to influence the response of weevils, for example female rice weevils have been shown to be less attracted to mated males than virgin males (Phillips and Burkholder, 1981). However, observations made in other beetles have shown mated status has no affect response (Oceallachin and Pyan, 1977; Phillips and Burkholder, 1981; Rochat *et al.*, 1991). Studies involving a synthetic version of the PC aggregation pheromone, *i.e.* GA (Eller and Bartelt, 1996), also indicate that physiological factors (mating status, starvation, etc.) of multivoltine PC responding to odours have no effect (Akotsen-Mensah, 2010). A different response between mated and virgin females in regards to pheromones could complicate biocontrol strategies based on pheromone traps if mated females were found to be less attracted to the traditional pheromone lures used, however in the current study there was no significant difference found between the mated vs. virgin females.

1.6.2 Headspace collections

High humidity (75% R.H.) yielded better GA emission than low humidity (25% R.H.). This is not surprising since PC are prone to desiccation, and humidity is an important factor in their survival (Garman and Zappe, 1929; Smith and Flessel, 1968; Butkewich and Prokopy, 1993). Results indicate that PC need high humidity not only for survival, but also for behavioural responses such as mate-seeking behaviour and pheromone emission. For example the palmetto weevil *Rhynchophorus cruentatus* (F.) prefers high humidity conditions indicating the possible presence of hygrometers to help locate suitable harbourage or cover sites (Weissling and Giblin-Davis, 1993; Weissling *et al.*, 1994); PC may also possess these receptors, which may allow them to locate suitable mating sites. Plums were found to significantly influence GA emission. The presence of food may be necessary for optimum pheromone emission, and PC seem to emit somewhat more pheromone when presented with plums than with apples. Therefore PC may require a food source in order to emit the optimal amount of pheromone. In some weevil species pheromone emission only takes place in the presence of an acceptable food source, as was seen with the palm weevil, *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) (Jaffé *et al.*, 1993). The presence of harbourage or cover also had a significant impact on pheromone emission, reducing the amount of GA emitted. In general, PC normally hide under litter or use thanatose behaviour when disturbed or preparing for hibernation (Garman and Zappe, 1929; Wigglesworth,

1953), and may therefore be less likely to signal their presence by emitting a pheromone. Based on this we hypothesize that when emitting pheromones, any type of cover may impede PC pheromone emission and / or dispersal.

1.6.3 EAG trials

The EAG responses of PC to grandlures indicate the possible presence of receptors for detecting different compounds based on grandisol. In this study no receptors have been identified, only that the insects can detect (through EAG experiments) GA, such as (\pm)GA, supporting the results of Leskey *et al.* (2009). However, according to Alm and Hall (1986) the club region of the antenna (used in EAG experiments herein) contains the highest concentration of potential olfactory receptors. Of the mixtures tested containing GA, grandlure III/IV was found to elicit the greatest response for both high and low doses. The above indicates that differences in electrophysiological responses of PC are dependent on pheromone concentration, similar to what is seen in other beetles, such as the banded Elm bark beetle *Scolytus schevyrewi* Semenov (Zhuge *et al.*, 2010) and the mulberry spotted longhorn beetle *Batocera horsfieldi* (Hope) (Lee *et al.*, 2011), and may be linked to behavioural responses for some beetles. For example the Mulberry spotted longhorn beetle demonstrated a strong EAG and behavioural attraction to a five-component composite of host plant volatiles (Yang *et al.*, 2011). Other Curculionidae species have shown behavioural responses to grandlures, such as

the boll weevil (Hardee *et al.*, 1974; Armstrong, 2010), the pepper weevil (Eller *et al.*, 1994), the pecan weevil *Curculio caryae* Horn (Hedin *et al.*, 1997), the strawberry blossom weevil (Innocenzi *et al.*, 2001; Cross *et al.*, 2006), and the cranberry weevil *Anthonomus musculus* Say (Szendrei *et al.*, 2011). Differences related to concentrations of lures containing GA has previously been shown to be an important factor regarding PC behaviour. For example, field studies demonstrated no an increase in PC attraction towards trap trees baited with twice the attractive amount of GA (Prokopy *et al.*, 2004). Concentration-dependent behavioural responses have also been observed in the cigarette beetle (Coffelt and Burkolder, 1972), the boll weevil (Hardee *et al.*, 1974), and the Asian palm weevil (Hallett *et al.*, 1999).

At the high dose, the grandlures as well as (+)GA and (±)GA are all similar in attraction, however, a higher purity of enantiomer may elicit a significantly higher EAG response, since only (+)GA is produced by males in the wild (Eller and Bartelt, 1996). Purity and concentration of enantiomers have been shown to affect the behavioural responses of some beetle species, such as the boll weevil and the Japanese beetle *Popillia japonica* Newman (Tumlinson *et al.*, 1977; Dickens, 1986). In EAG trials using increasing amounts of (+)GA and decreasing amounts of the (–) enantiomer, an increase in magnitude of response was also seen (Leskey *et al.*, 2009). These results may only be apparent when (+)GA is tested at the highest purity and at the most stimulating concentration. Otherwise it appears that, as demonstrated in the current

study, (+)GA elicits similar EAG responses to that of other GA containing compounds (*e.g.* (\pm)GA, grandlures).

Future studies should focus on pheromone identification in order to develop better trap-baits and improve monitoring techniques. In general, the best conditions for pheromone collections are groups of eight (personal observations; Dr. T. Leskey, personal communication, 14 December 2009) mature PC (at least eight – 20 days old). The PC used for pheromone collections should be fed on plums with little or no cover present. High humidity conditions are very important and provide greater pheromone emission, and one can expect higher numbers of PC on fruit (or in traps) during very humid days. This may help in predicting when to apply insecticides more precisely (thus reducing the overall number of insecticide applications). Other Curculionidae species responding to grandisol (boll weevil, strawberry blossom weevil, pepper weevil) have been shown to produce multi-component aggregation pheromones (Tumlinson *et al.*, 1969; Eller *et al.*, 1994; Innocenzi *et al.*, 2001), and the situation is likely similar for PC. Field trials can be done using (+)GA or grandlures, since PC have shown responses to the grandisol contained within the lures. Additionally, PC pheromones have previously been shown to synergize with host-plant volatiles (Piñero *et al.*, 2001; Leskey *et al.*, 2005; Akotsen-Mensah *et al.*, 2010). Combining (+)GA, the naturally produced pheromone component of PC, with other pheromone compounds or host plant volatiles, such as those from plums, may further increase PC attraction. Such phenomena have been observed in other insects (Landolt and Phillips, 1997), where

attractive host plant volatiles have been shown to synergize with aggregation pheromones. This synergy can be used to increase trap captures, as is the case for the palm weevil (Jaffé *et al.*, 1993) and the Asian palm weevil (Hallett *et al.*, 1999). This is also likely to be the best strategy for efficient monitoring of PC.

1.7 Acknowledgement

We would like to thank Sylvie Bellerose, Franz Vanoosthyuse, Anne-Lyse Larouche, Marie-Pier Richard, Martin Duquette, Robert Maheux, and Torri Hancock for their assistance in the laboratory and field, and to Clement Akotsen-Mensah for his suggestions and advice on olfactometer experiments. These studies were supported by a grant from Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire de Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (Québec, Qc.) and in part by grant # 2009-51181-06005 from USDA-NIFA Specialty Crops Research Initiative.

1.8 Bibliography

- AKOTSEN-MENSAH, C. (2010). *Ecology and management of plum curculio, Conotrachelus nenuphar (Coleoptera: Curculionidae) in Alabama Peaches*. Mémoire de Doctorat, Auburn University, Alabama, USA. 180 p.
- ALM, S.R., et F.R. HALL (1986). Antennal sensory structures of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79: 324-333.
- ALTUZAR, A., E.A. MALO, H. GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ et J.C. ROJAS (2007). Electrophysiological and behavioural responses of *Scyphophorus acupunctatus* (Col., Curculionidae) to Agave tequilana volatiles. *J. Appl. Entomol.* 131(2): 121-127.
- AMIS, A., et J.J. SNOW (1985). « *Conotrachelus nenuphar* ». P. Singh et R. F. Moore, (éds.), *Handbook of Insect Rearing*, Vol. 1. New York, Elsevier Science Publishing, p. 227-236.
- ARMSTRONG, J.S. (2010). Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae) Response to and volatilization rates of grandlure when combined with varying doses of Eugenol in the extended-life pheromone lure. *J. Econ. Entomol.* 103(2): 356-359.
- ASPI, J., et A.A. HOFFMAN (1998). Female encounter rates and fighting costs of males are associated with lek size in *Drosophila mycetophaga*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 42:163-169.
- BUTKEWICH, S.L., et R.J. PROKOPY (1993). The effect of short-range host odor stimuli on host fruit finding and feeding behavior of plum curculio adults. *J. Chem. Ecol.* 19: 825-835.
- BUTKEWICH, S.L., R.J. PROKOPY et T.A. GREEN (1987). Discrimination of occupied host fruit by plum curculio females (Coleoptera: Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* 13(8): 1833-1841.
- CHOUINARD G., S.B. HILL et C. VINCENT (1993). Spring behavior of the plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) within caged dwarf apple trees. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 86: 333-340.

- CHOUINARD, G., S.B. HILL et C. VINCENT (1994). Spatial distribution and movements of plum curculio adults within caged apple trees. *Entomol. Exper. App.* 70: 129-142.
- COFFELT, J.A., et W.E. BURKHOLDER (1972). Reproductive biology of the cigarette beetle *Lasioderma serricorne*. 1. Quantitative laboratory bioassay of the female sex pheromone from females of different ages. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 65: 447-450.
- CROSS J.V., H. HESKETH, C.N. JAY, D.R. HALL, P.J. INNOCENZI, D.I. FARMAN et C.M. BURGESS (2006). Exploiting the aggregation pheromone of strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi* Herbst (Coleoptera: Curculionidae): Part 1. Development of lure and trap. *Crop Prot.* 25: 144-154.
- DE GRAAF, J., P. GOVENDER, A.S. SCHOEMAN et A. VILJOEN (2005). Efficacy of pseudostem and pheromone seasonal trapping of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus* in South Africa. *Inter. J. Pest Manag.* 00(0): 1-10.
- DICKENS, J.C. (1986). Orientation of boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae) to pheromone and volatile host compound in the laboratory. *J. Chem. Ecol.* 12: 91-98.
- DICKERSON, W.A., R.L. RIDGEWAY et F.R. PLANER (1987). *Southeastern boll weevil eradication program, improved pheromone trap, and program status*. Proceedings of Beltwide Cotton Research and Production Conference, National Cotton Council, Memphis, T.N., p. 335-337.
- DIXON, B.M., R.J. PROKOPY et B.B. SCHULTZ (1999). Influence of weather and time of day on plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) tree canopy entry behaviors and evaluation of traps for predicting fruit injury. *J. Entomol. Sci.* 34: 191-202.
- ELLER, F.J., et R.J. BARTELT (1996). Grandisoic acid a male produced aggregation pheromone from the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*. *J. Nat. Prod.* 59: 451-453.
- ELLER, F.J., R.J. BARTELT, B.S. SHASHA, D.J. SCHUSTER, D.G. RILEY, P.A. STANSLY, T.F. MUELLER, K.D. SHULER, B. JOHNSON, J.H. DAVIS et C.A. SUTHERLAND (1994). Aggregation pheromone for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): identification and field activity. *J. Chem. Ecol.* 20(7): 1537-1555.

- GARMAN, P., et M.P. ZAPPE (1929). Control studies on the plum curculio in Connecticut apple orchards. *Conn. Agri. Stat. Bull.* 301: 373-437.
- HALLETT, R.H., A.C. OEHLISCHLAGER et J.B. BORDEN (1999). Pheromone trapping protocols for the Asian palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Intern. J. Pest Manag.* 45: 231-237.
- HARDEE, D.D., G.H. MCKIBBEN, D.R. RUMMEL, P.M. HUDDLESTON et J.R. COPPEDGE (1974). Response of boll weevils to component ratios and doses of the pheromone, Grandlure. *Environ. Entomol.* 3: 135-138.
- HEDIN, P.A., D.A. DOLLAR, J.K. COLLINS, J.G. DUBOIS, P.G. MULDER, G.H. HEDIN, M.W. SIMTH et R.D. EUCRENBARY (1997). Identification of male pecan weevil pheromone. *J. Chem. Ecol.* 23: 965-977.
- HOFFMANN, E.J., A.B. COOMBS et M.E. WHALON (2004). Reproductive development of northern and southern strains of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 97(1): 27-32.
- HOFFMANN, E.J., J. VANDERJAGT et M.E. WHALON (2007). Pyriproxyfen reproduction in prediapause northern strain plum curculio (*Conotrachelus nenuphar* Herbst). *Pest Manag. Sci.* 63: 835-840.
- HÖLGUND, J., et R. ALATALO (1995). *Leks*. New Jersey, Princeton University, 224p.
- INNOCENZI, P.J., D.R. HALL et J.V. CROSS (2001). Components of male aggregation pheromone of strawberry blossom weevil, *Anthonomus rubi* Herbst. (Coleoptera: Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* 27(6): 203-218.
- JAFFÉ, K., P. SÁNCHEZ, H. CERDA, J.V. HERNÁNDEZ, R. JAFFÉ, N. URDANETA, G. GUERRA, R. MARTÍNEZ et B. MIRAS (1993). Chemical ecology of *Rhynchophorus palmarum*: attraction to host plants and to a male-produced aggregation pheromone. *J. Chem. Ecol.* 19: 1703-1720.
- JOHNSON, A.W., et S.B. HAYS (1969). Laboratory mating behaviour of the plum Curculio. *J. Econ. Entomol.* 62(2): 438-440.
- JONES, T.M., A. BALMFORD et R.J. QUINNELL (2000). Adaptive female choice for middle-aged mates in a lekking sand fly. *Proc. Royal Soc. Lond. Biol. Sci.* 267: 681-686.

- JUTSUM, A.R., et R.F.S GORDON (1989). « Pheromones: importance to insects and role in pest management ». A.R. Jutsum et R.F.S. Gordon (éds), *Insect pheromones in plant protection*. New York, John Wilen and Sons Ltd. p. 1-13.
- KEITT, T., M. LEWIS et R. HOLT (2001). Allee effects, invasion pinning, and species' borders. *Am. Nat.* 157: 203–216.
- KUWAHARA, Y., H. FUKAMI, S. ISHII, F. MATSUMURA et W.E. BURKHOLDER (1975). Studies on the isolation and bioassay of the sex pheromone of the drugstore beetle, *Stegobium paniceum* (Coleoptera: Anobiidae). *J. Chem. Ecol.* 1(4): 413-422.
- LAFLEUR, G., et S.B. HILL (1987). Spring migration, within-orchard dispersal, and apple-tree preference of the plum curculio in Southern Quebec. *J. Econ. Entomol.* 80: 1173-1187.
- LAMOTHE, S., G. CHOUINARD et C. VINCENT (2008). Abiotic factors and trap design modulate the performance of traps used to monitor the plum curculio. *J. Econ. Entomol.* 101(6): 1838-1846.
- LAN, Z., H. SCHERM et D.L. HORTON (2004). Temperature-dependent development and prediction of emergence of the summer generation of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in the southeastern United States. *Environ. Entomol.* 33: 174–181.
- LANDOLT, P.J., et T.W. PHILLIPS (1997). Host plant influences on sex pheromone behaviour of phytophagous insects. *Ann. Rev. Entomol.* 42: 371-391.
- LE BLANC, J.P.R. (1992). *Trapping and monitoring techniques for plum curculio, Conotrachelus nenuphar (Herbst), (Coleoptera: Curculionidae) in a southwestern Quebec apple orchard*. Mémoire de Doctorat. McGill University, Quebec, Canada.
- LE BLANC, J.P.R., S.B. HILL et R.O. PARADIS (1984). Oviposition in scout-apples by plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae), and its relationship to subsequent damage. *Environ. Entomol.* 13: 286-291.
- LEE, J.C., J.F. NEGRÓON, S.J. MCELWEY, L. WILLIAMS, J.J. WITCOSKY, J.B. POPP et S.J. SEYBOLD (2011). Biology of the invasive banded elm bark beetle (Coleoptera: Scolytidae) in the Western United States. *Ann. Entomol. Soc. of Am.* 104(4): 705-717.

- LESKEY, T.C., et R.J. PROKOPY (2001). Adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) attraction to fruit and conspecific odors. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 275-288.
- LESKEY, T.C., et R.J. PROKOPY (2002). A branch-mimicking trap for capturing adult plum curculios (Coleoptera: Curculionidae). *Entomol. Exp. Appl.* 102: 253-259.
- LESKEY, T.C., et S. WRIGHT (2004). Monitoring plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae), population in apple and peach orchards in the Mid-Atlantic. *J. Econ. Entomol.* 97(1): 79-88.
- LESKEY, T.C., et S. WRIGHT (2007). Host preference of the plum curculio. *Entomol. Exp. Appl.* 123: 217-227.
- LESKEY, T.C., A.J. ZHANG et M. HERZOG (2005). Nonfruiting host tree volatile blends: Novel attractants for the plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 34(4): 785-793.
- LESKEY, T.C., S. WRIGHT, W. ANGER, G. CHOUINARD, D. CORMIER, A. PICHETTE et A. ZHANG (2009). Electroantennogram technique for *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 38(3): 870-878.
- LESKEY, T.C., T.J. HANCOCK et S. WRIGHT (2010). Host tree-related differences in trap captures and electroantennogram activity for the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae). *Can. Entomol.* 142: 284-293.
- LESKEY, T.C., S.E. WRIGHT, V. HOCK, G. CHOUINARD, D. CORMIER, K. LEAHY, D. COOLEY, A. TUTTLE, A. EATON et A. ZHANG (2014). Evaluating electrophysiological and behavioral responses to volatiles for improvement of odor-baited trap-tree management of *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 43(3):753-761.
- MØLLER, A.P., et S. LEGENDRE (2001). Allee effect, sexual selection and demographic stochasticity. *Oikos*. 92: 27-34.
- MULDER, P.G., B.D. MCCRAW, W. REID et R.A. GRANTHAM (1997). *Monitoring adult weevil populations in pecan and fruit trees in Oklahoma*. Oklahoma, Oklahoma State University Extension Facts Stillwater, F-7,190: 1-8.

- NIELSEN, B.S., et T.S. JENSEN (1993). Spring dispersal of *Sitona lineatus*: the use of aggregation pheromone trap for monitoring. *Ent. Exp. App.* 66: 21-30.
- O'CELLACHAIN, D.P., et M.F. RYAN (1977). Production and perception of pheromones by the beetle *Tribolium confusum*. *J. Insect Phys.* 23:1303-1309.
- OTTE, D. (1974). Effects and functions in the evolution of signaling systems. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 5: 385-417.
- PADULA, A.L., et E.H. SMITH (1971). Reproductive incompatibility between univoltine males and multivoltine females of the plum curculio. *Ann. Soc. Entomol. Am.* 64: 665-668.
- PHILLIPS, J.K., et W.E. BURKHOLDER (1981). Evidence for a male-produced aggregation pheromone in the rice weevil. *J. Econ. Entomol.* 74: 539-542.
- PIÑERO, J., et R.J. PROKOPY (2003). Field evaluation of plant odour and pheromonal combinations for attracting plum curculios. *J. Chem. Ecol.* 29: 2735-2748.
- PIÑERO, J. et R.J. PROKOPY (2004). Predicting Plum curculio immigration into apple orchards in Massachusetts: Degrees days versus tree phenology. *Fruit Notes.* 69: 1-7.
- PIÑERO, J.C., S. WRIGHT et R.J. PROKOPY (2001). Response of plum Curculio (Coleoptera: Curculionidae) to odor-baited traps near woods. *J. Econ. Entomol.* 94(6): 1386-1397.
- PIÑERO J.C., A.M. AGNELLO, A. TUTTLE, T.C. LESKEY, H. FAUBERT, G. KOEHLER, L. LOS, G. MORIN, K. LEAHY, D.R. COOLEY et R.J. PROKOPY (2011). Effectiveness of odor-baited trap trees for plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) monitoring in commercial apple orchards in the Northeast. *J. Econ. Entomol.* 104: 1613-1621.
- PROKOPY, R.J., et S. WRIGHT (1997). How do plum curculios approach host trees and pyramid traps? *Fruit Notes.* 62: 5-8.
- PROKOPY, R.J., et S. WRIGHT (1998). Plum curculio responses to unbaited pyramid and cone traps. *J. Econ. Entomol.* 91: 225-234.

- PROKOPY, R.J., S.S. COOLEY et P.L. PHELAN (1995). Bioassay approaches to assessing behavioral responses of plum curculio adults (Coleoptera: Curculionidae) to host fruit odor. *J. Chem. Ecol.* 21(8): 1073-1084.
- PROKOPY, R.J., I. JACOME, E. GRAY, G. TRUJILLO, M. RICCI et J.C. PIÑERO (2004). Using odor-baited trap trees as sentinels to monitor plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in apple orchards. *J. Econ. Entomol.* 97: 511-517.
- RACETTE, G., G. CHOUINARD, S.B. HILL et C. VINCENT (1991). Activity of adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) on apple trees in spring. *J. Econ. Entomol.* 84: 1827-1832.
- RACETTE, G., G. CHOUINARD, C. VINCENT et S.B. HILL (1992). Ecology and management of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae), in apple orchards. *Phyto.* 73: 85-100.
- ROCHAT, D., C. MALOSSE, M. LETTERE, P.H. DUCROT, P. ZAGATTI, M. RENOU et C. DESCOINA (1991). Male-produced aggregation pheromone of the American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): collection, identification, electrophysiological activity, and laboratory bioassay. *J. Chem. Ecol.* 17: 2127-2141.
- SARAI, D.S. (1969). Seasonal history of the plum curculio in the Missouri Ozarks. *J. Econ. Entomol.* 62: 1222-1224.
- SHAFFER, J.P. (1995). Multiple hypothesis testing. *Ann. Rev. Psy.* 46: 561-584.
- SHELLY, T.E., et T.S. WHITTIER (1997). « Lek behaviour of insects » B. Crespi, et J.C. Choe (éds). *The evolution of mating systems in insects and arachnids*. Cambridge, UK, Cambridge Press, p. 273-293.
- SHU, S., Y.I. PARK, S.B. RAMASWAMY et A. SRINIVASAN (1998). Temporal profiles of juvenile hormone titers and egg production in virgin and mated females of *Heliothis virescens* (Noctuidae). *J. Ins. Physiol.* 44: 1111-1117.
- SIEGEL, S. et N.J. CASTELLAN (1988). *Nonparametric statistics for the behavioural sciences*. 2nd Edition, New York: McGraw-Hill, 399 p.
- SILVERSTEIN, R. M. (1990). « Practical use of pheromones and other behavior-modifying compounds: overview. ». R. Ridgway R. Silverstein et M. Inscoe (éds), *Behavior-modifying chemicals for insect management*, New York, Marcel Dekker Inc., p. 1-8.

- SMART, L.E., M.M. BLIGHT, J.A. PICKETT et B.J. PYE (1994). Development of field strategies incorporating semiochemicals for the control of the pea and bean weevil, *Sitona lineatus* L. *Crop Protect.* 13(2): 127-135.
- SMITH, E.H. (1957). A method for rearing plum curculio under laboratory conditions including some biological observations. *J. Econ. Entomol.* 50(2): 187-190.
- SMITH, E.H., et J.K. FLESSEL (1968). Hibernation of the plum curculio and its spring migration to host trees. *J. Econ. Entomol.* 61(1): 193-203.
- SMITH, E.H., et E.H. SALKELD (1964). Ovary development and oviposition rates in the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 57: 781-787.
- SPURGEON, D.W. (2003). Age dependence of pheromone production by the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 32(1): 31-38.
- SZENDREI, Z., A. AVERILL, H. ALBORN et C. RODRIGUEZ-SAONA (2011). Identification and field evaluation of attractants for the cranberry weevil, *Anthonomus musculus* Say. *J. Chem. Ecol.* 37: 387-397.
- THOMPSON, J.R. (1932). Sex differentiation of adults of *Conotrachelus nenuphar*. *J. Econ. Entomol.* 25: 807-810.
- TINZAARA, W., C.S. GOLD, M. DICKE, A.V. HUIS et P.E. RAGAMA (2007). Host plant odours enhance the responses of adult banana weevil to the synthetic aggregation pheromone cosmolure®. *Inter. J. Pest Manage.* 53(2): 127-137.
- TUMLINSON, J.H., D.D. HARDEE, R.C. GUELDER, A.C. THOMPSON, P.A. HEDIN et J.P. MINYARD (1969). Sex pheromones produced by male boll weevil: isolation, identification, and synthesis. *Science.* 166: 1010-1012.
- TUMLINSON, J.H., M.G. KLEIN, R.E. DOOLITTLE, T.L. LADD et A.T. PROVEAUX (1977). Identification of the female Japanese beetle sex pheromone: inhibition of male response by an enantiomer. *Science.* 197: 789-792.
- VINCENT, C., et M. ROY (1992). Entomological limits to biological control programs in Québec apple orchards. *Acta. Phytopathol. Entomol. Hung.* 27: 649-657.
- WEISSLING, T.J., et R.M. GIBLIN-DAVIS (1993). Water loss dynamics and humidity preference of *Rhynchophorus cruentatus* (Coleoptera: Curculionidae) adults. *Envir. Entomol.* 22: 94-98.

- WEISSLING, T.J., R.M. GIBLIN-DAVIS, B.J. CENTER et T. HIYAKAWA (1994). Flight behaviour and seasonal trapping of *Rhynchophorus cruentatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 641-647.
- WELDON, C.W. (2007). Influence of male aggregation size on female visitation in *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae). *Aust. J. Entomol.* 46: 29-34.
- WIGGLESWORTH, V.B. (1953). *The principles of insect physiology*. London, Methuen and Co. Ltd. 546 p.
- YANG, H., W. YANG, X.-Y. LIANG, M.-F. YANG, C.-P. YANG, T.-H. ZHU et X.-L. Wu. (2011). The EAG and behavioural responses of *Batocera horsfieldi* (Coleoptera: Cerambycidae) to the composition of volatiles. *J. Kansas Entomol. Soc.* 84(3): 217-231.
- ZHANG, X., et D.G. PFEIFFER (2008). Evaluation of reproductive compatibility of interstrain matings among plum curculio populations in the eastern United States. *Envir. Entomol.* 37(5): 1208-1213.
- ZHANG, A., H.T. FACUNDO, P.S. ROBBINS, C.E. LINN, J.L. HANULA, M.G. VILLANI et W.L. ROELOFS (1994). Identification and synthesis of female sex pheromone of oriental beetle, *Anomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Chem. Ecol.* 20: 2415-2427.
- ZHANG, X., S. LUCKHART, Z. TU et D.G. PFEIFFER. (2010). Analysis of *Wolbachia* strains associated with *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) in the Eastern United States. *Environ. Entomol.* 39(2): 396-405.
- ZHUGE, P.-P., S.-L. LUO, M.-Q. WANG et G. ZHANG (2010). Electrophysiological responses of *Batocera horsfieldi* (Hope) adults to plant volatiles. *J. App. Entomol.* 134: 600-607.

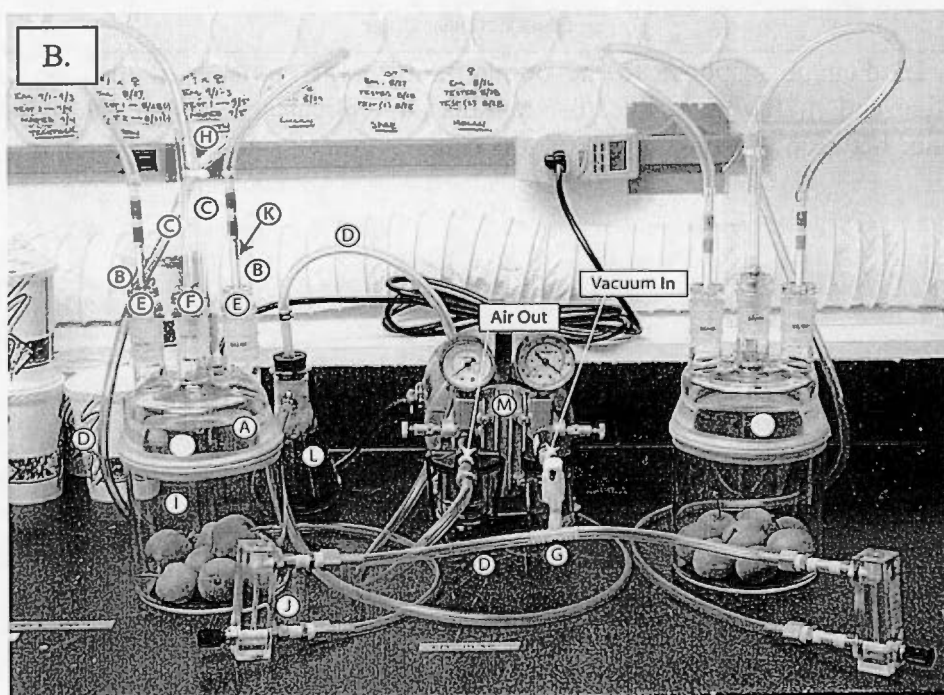
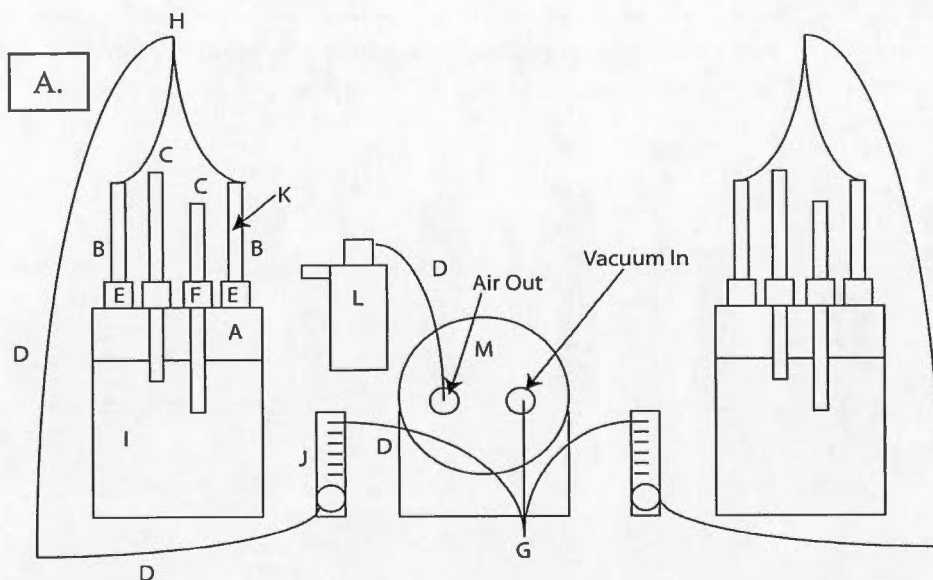


Figure 1.1 Dual source (laboratory) headspace collection apparatus. A. Schematic. B. Actual setup. A = Reaction Flask Head; B = Inner Joint (Sample Tube); C = Inner Joint (Filter Tube); D = Tubing, PVC; E = Adapter (Sample Tube); F = Adapter (Filter Tube); G = T-Type Connectors; H = Y-Type Connectors; I = Cylindrical Glass Chamber; J = Clear Flow Rotameter; K = SuperQ; L = Activated Charcoal Flask Filter (cleans exhaust air); M = Vacuum Pump.

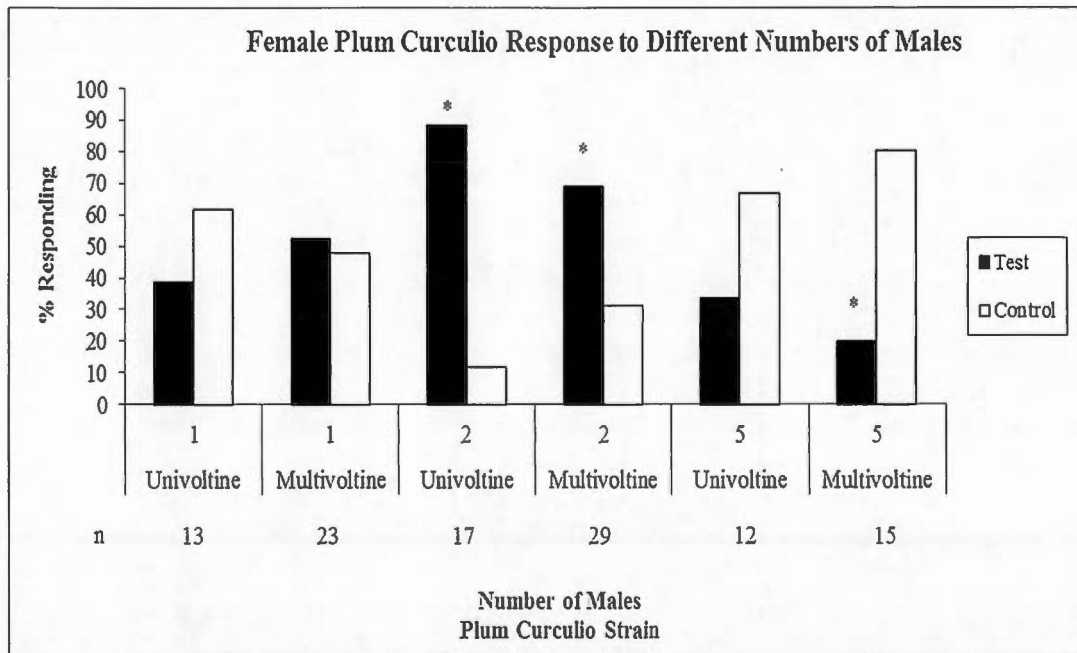


Figure 1.2 Female response to the odour of different numbers of males for both univoltine and multivoltine PC. n = number or replicates, * denotes a significant difference between test and control odours using χ^2 test ($P = 0.05$).

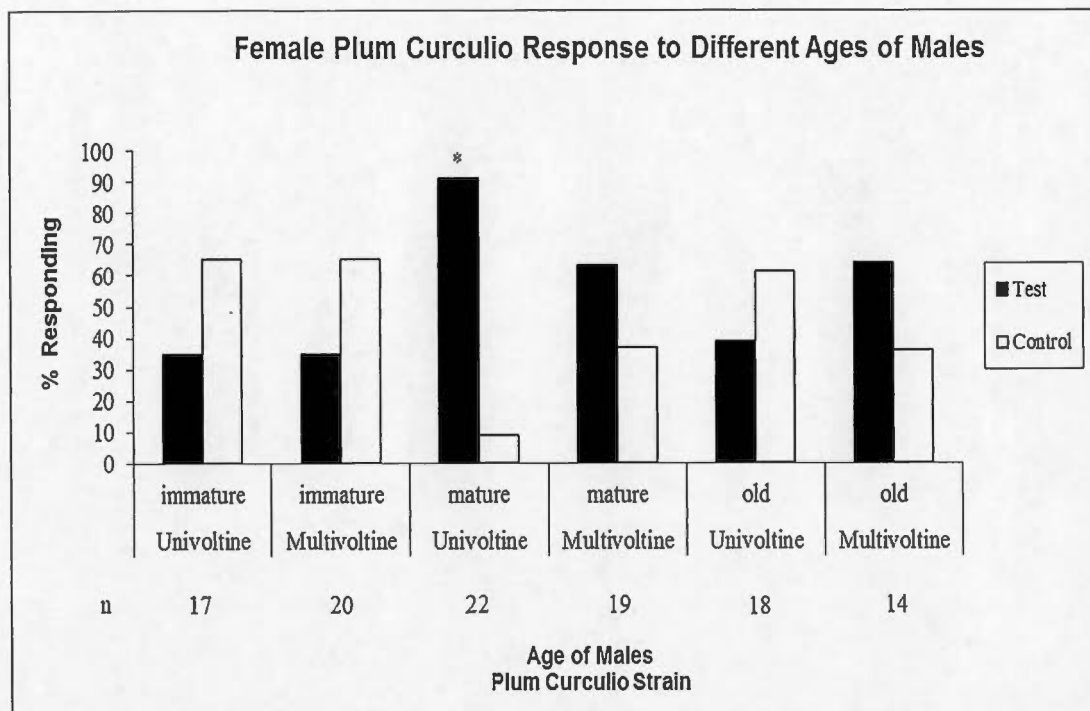


Figure 1.3 Female response to the odour of different ages of males for both univoltine and multivoltine plum curculio. n = number of replicates, * denotes a significant difference between test and control odours using χ^2 test ($P = 0.05$).

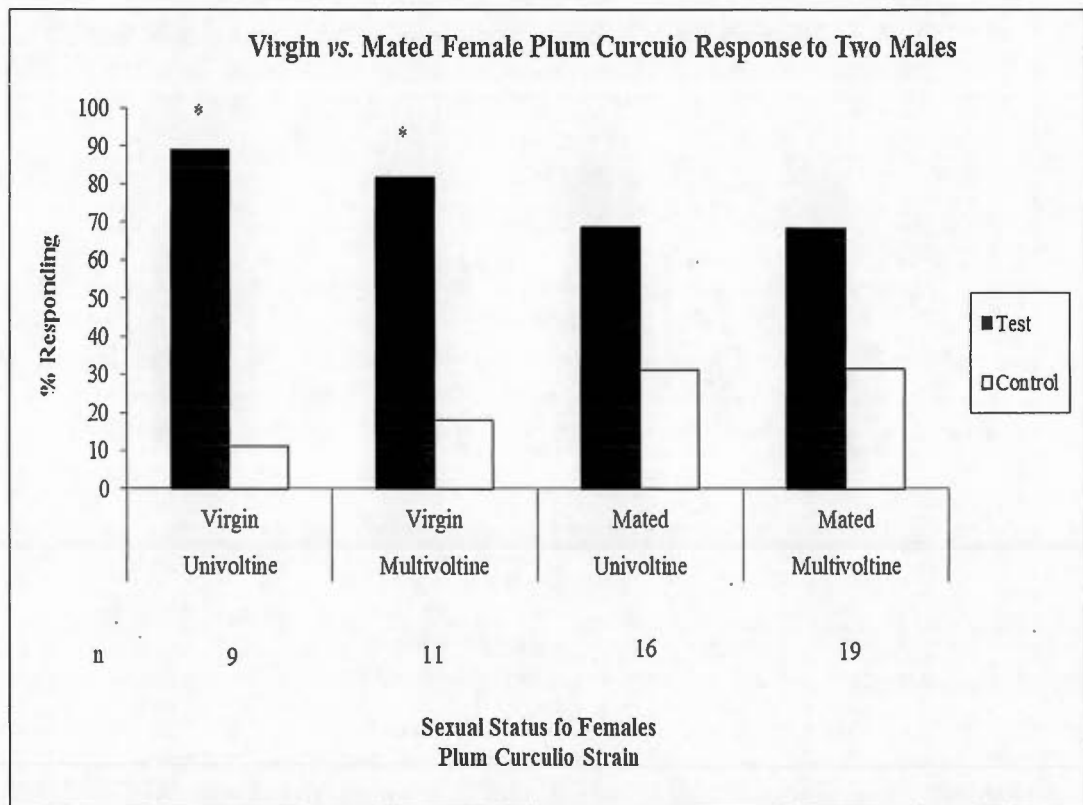


Figure 1.4 Virgin and Mated female response to the odour of two males for both univoltine and multivoltine PC. n = number or replicates, * denotes a significant difference between test and control odours using χ^2 test ($P = 0.05$).

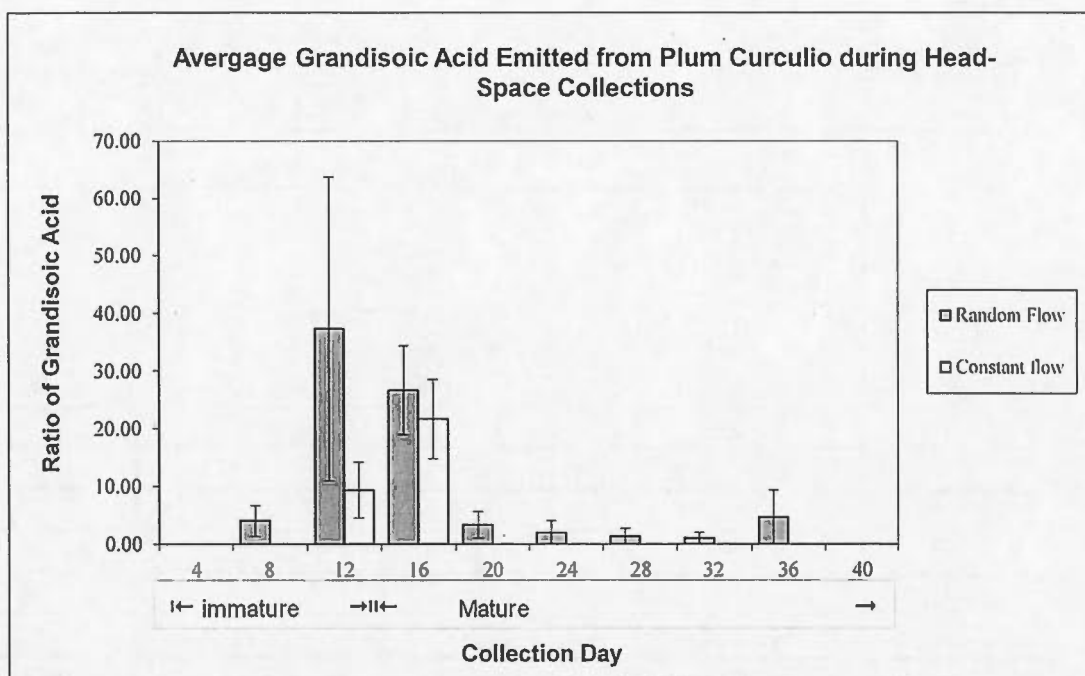


Figure 1.5 Average grandisoic acid emission from eight virgin male multivoltine plum curculio during headspace collections throughout the 40 first days of adult life. Day of collection represents the day on which the collection took place (all males were four days old at day four, eight days old at day eight, etc.). The average ratio of grandisoic acid emitted is given (\pm S.E.), and is taken from three replicates per the two modalities (random vs. constant airflow). Males aged < 12 days were considered immature.

Table 1.1 Average grandisoic acid peak in each modality from each collection during headspace trials, as well as the highest magnitude grandisoic acid peak detected for each modality

Modality	Headspace Collections			Number of Containers Where grandisoic acid was detected
	Description	Average Peak Magnitude*	Highest peak	
Extractions	Random	8.48	90.00	3
	Constant	3.21	30.00	3
Flow rate	0.5L/min	0.14	0.24	2
	1 L/min	1.83	8.88	2
Collection tube Strata	Lower position	3.16	13.94	3
	Standard position	3.68	21.57	2
Humidity I	15%	2.53	18.17	3
	75%	10.73	41.97	3
Humidity II	25%	1.71	1.71	1
	75%	8.00	22.46	3
Temperature and Humidity	20°C (25% R.H.)	7.58	13.39	1
	30°C (75% R.H.)	2.75	4.38	2
Food Source	8 plums	17.94	46.78	2
	0 plums	0.86	0.86	1
Harbourage	folded paper (refuge)	0.17	1.20	1
	control (no refuge)	0.30	0.42	2

*taken only from those containers where GA was found to be emitted (maximum of 3 containers per modality). R.H. = relative humidity.

Table 1.2 Summary of Wald's statistic from logistic regression analysis of influence of modality on grandisoic acid emission in headspace collections

Modality	Coefficient	S.E.	Wald	<i>df</i>	<i>P</i>	Odds Ratio
Airflow	0.981	0.589	2.771	1	0.096	2.667
Strata	-1.335	0.721	3.432	1	0.064	0.263
Humidity I	-9.817	69.928	0.020	1	0.888	0.000
Humidity II	5.278	1.464	13.001	1	0.000*	195.896
Temperature and Humidity	1.273	0.971	1.718	1	0.190	3.571
Flow Rate	-1.723	0.984	3.066	1	0.080	0.179
Harbourage	-2.565	0.936	7.502	1	0.006*	0.077
Plums	2.398	1.193	4.037	1	0.045*	10.999

* denotes a significant effect of the headspace modality according to Wald's Statistic ($P=0.005$). S.E. = standard error, *df* = degrees of freedom.

Table 1.3 Mean electroantennogram response obtained from adult plum curculios for synthetic odours

Odour Modality	Response to Different Electroantennogram Trials (mV)		
	High Dose Trials 0.010 g/mL	Low Dose Trials 0.001 g/mL	Synthetic Pheromone Trials 0.010 * and 0.001** g/mL
Dichloromethane Control	68.7 ± 8.5 a ¹	69.0 ± 5.9 a	54.1 ± 6.7 a
(+) enantiomer of grandisoic acid	153.2 ± 19.3 b	90.8 ± 7.5 a	159.1 ± 8.5 b* 154.7 ± 6.5 b**
Grandlure I	196.2 ± 18.6 b	137.2 ± 12.1 b	Not applicable
Grandlure II	154.5 ± 16.0 b	100.5 ± 7.5 a	Not applicable
Grandlure III/IV	204.8 ± 20.6 b	172.5 ± 13.9 b	Not applicable
Racemic mixture of grandisoic acid	Not applicable	Not applicable	152.1 ± 6.6 b*
'Stanley' plum	Not applicable	Not applicable	288.8 ± 12.7 c
Trans-2-hexenal	320.4 ± 21.1 c	264.4 ± 16.8 c	316.6 ± 10.4 c*

Mean (± S.E.) electroantennogram response (mV) for plum curculio from each synthetic pheromone or grandlure odour modality, evaluated at two concentrations, and from trans-2-hexenal (0.010 g/mL), 'Stanley' plum standard, and dichloromethane control (0.0 g/mL). Synthetic pheromone trials were done using the racemic and the (+) enantiomer of grandisoic acid. ¹Different letters in the same column indicate significant differences according to Tukey's HSD (P < 0.05). * denotes response to 0.010 g/mL dose; ** denotes response to 0.001 g/mL dose.

CHAPITRE II

BEHAVIORAL RESPONSES OF PLUM CURCULIO (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) TO DIFFERENT ENANTIOMER CONCENTRATIONS AND BLENDS OF THE SYNTHETIC AGGREGATION PHEROMONE GRANDISOIC ACID

2.1 Mise en contexte

Les résultats du chapitre précédent ont révélé que, tant pour la souche univoltine que pour la souche multivoltine du CP, l'odeur de deux mâles vierges matures suscitait la plus grande attraction des femelles vierges matures par rapport à d'autres âges et à d'autres nombres de mâles. Cela indique que deux mâles matures produisent la quantité de composés olfactifs optimale pour attirer les femelles et que les composés émis peuvent consister en une phéromone d'agrégation telle que l'AG. Les résultats sur l'émission de la phéromone agrégative émise par le CP ont indiqué que celui-ci produit davantage de phéromone en présence de son fruit préféré, la prune, et d'un taux d'humidité élevée. De plus, selon les résultats de l'EAG il a été démontré que le CP pouvait détecter de la phéromone synthétique dans plusieurs mélanges.

Dans le chapitre précédent, il a été déterminé que les CP pouvaient détecter la phéromone synthétique alors que le but de ce chapitre (II) était de préciser quel mélange phéromonaux (*p.ex.* : énantiomère, concentration, niveau de pureté) possédant le plus grand pouvoir d'attraction sur les femelles. Des tests ont été effectués dans un olfactomètre vertical à deux voies sans pression d'air, en utilisant la version synthétique du composé majeur de la phéromone d'agrégation du CP avec des femelles comme réceptrices. Ce chapitre est une version légèrement modifiée, à la demande de

l'Université, d'un article originalement publié dans la revue « Journal of Economic Entomology » DOI: 10.1093/jee/tov026, pp. 1-10, 2015.

2.2A Résumé

Le charançon de la prune *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae), est un important ravageur des fruits de l'Amérique du Nord. Les mâles produisent une phéromone agrégative – l'acide grandisoïque – qui attire les mâles et femelles de la souche univoltine du nord et de la souche multivoltine du sud. L'acide grandisoïque ((1*R*,2*S*)-1-méthyl-2-(1-méthyléthényle)-cyclobutaneacetic acid) est une molécule qui contient un centre chiral exprimant la possibilité de deux énantiomères. La version synthétique de cette phéromone contient au départ des quantités égales d'énantiomère (+) et (-) appelé mélange racémique. Cependant la phéromone produite naturellement par les mâles contient seulement l'énantiomère (+). Certains énantiomères peuvent empêcher l'attraction aux phéromones chez les autres charançons. Pour cette raison une bonne compréhension du comportement du charançon est nécessaire afin de développer des appâts plus efficaces. Des bioessais ont été effectués à l'aide d'un olfactomètre vertical à deux voies sans courant d'air, avec une quantité de 1,5 mL de chaque énantiomère et du mélange racémique d'acide grandisoïque, avec des femelles vivantes comme réceptrices afin de déterminer la concentration et le niveau de pureté les plus attirants pour les femelles. L'énantiomère (+) de l'acide grandisoïque avec un excès énantiomérique (pureté, *c.-a.-d.* une mesure du degré par rapport auquel un échantillon contient une plus grande quantité d'un énantiomère que de l'autre) de 72% a été le plus attirant pour les femelles matures vierges. Les deux souches ont été attirées par de faibles concentrations de cet énantiomère, mais à des concentrations différentes (2×10^{-7} mg/mL pour la souche univoltine, 2×10^{-9} mg/mL pour la souche multivoltine). Les résultats ont démontré que la quantité d'AG(-) présente dans une mélange synthétique d'AG peut affecter la réponse des femelles, et que l'AG(+) à des concentrations le plus attractives et hautement purifiées peut être utilisé comme composé d'appâts afin d'attirer le

charançon. C'est la première fois que l'attraction de l'énantiomère (+) par rapport à l'énantiomère (-) a été démontré.

MOTS-CLÉS : charançon de la prune, *Conotrachelus nenuphar*, acide grandisoïque, grandlure, grandisol, phéromone agrégative, attractif, répulsif, coléoptère, Curculionidae, odeur, volatil, olfactomètre.

2.2B Abstract

The plum curculio *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) is an important pest of fruit in North America. Males produce an aggregation pheromone (grandisoic acid), which attracts both sexes of the northern univoltine and the southern multivoltine strains. Grandisoic acid ((1*R*,2*S*)-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-cyclobutaneacetic acid) is a chiral molecule containing a chiral center. A synthetic racemic mixture will contain two optical isomers that are mirror images of each other with equal amounts of (+)- and (-) enantiomeric isomers. Male plum curculio only produce the (+) enantiomer. Some enantiomers can have antagonistic effects on the attraction of weevils to pheromones. An understanding of the effect of both enantiomers on the behaviour of plum curculio is needed to develop more efficient trap baits. Behavioural bioassays were conducted in a dual choice still-air vertical olfactometer using a quantity of 1.5 mL of both (+) and (-) synthetic enantiomers and the racemic mixture of grandisoic acid, with live female responders to determine which concentration and enantiomeric purity is the most attractive. Plum curculio were attracted to low concentrations of the (+) enantiomer at 72% enantiomeric excess, but strains were attracted to different concentrations of the (+) enantiomer (2×10^{-7} mg/mL for univoltine, 2×10^{-9} mg/mL for multivoltine).

KEY WORDS: Plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, grandiosic acid, grandlure, grandisol, aggregation pheromone, attractants, repellents, coleoptera, Curculionidae, weevil, odours, volatiles, olfactometer.

2.3 Introduction

One of the most important native pests of fruits in eastern North America is the plum curculio *Conotrachelus nenuphar* (Herbst), 1797 (Coleoptera: Curculionidae). Damage at harvest from this pest in pome and stone fruit can be extreme (Vincent and Roy, 1992). There are two reproductively incompatible strains of this insect (Padula and Smith, 1971; Zhang and Pfeiffer, 2008; Zhang *et al.*, 2010), a northern univoltine strain with an obligatory diapause, and a multivoltine southern strain with a facultative diapause (Racette *et al.*, 1992).

Plum curculio (PC), like most insects (Bernays and Chapman 1994), use olfaction to locate conspecifics and fruit for mating, feeding and oviposition (Butkewich *et al.*, 1987; Butkewich and Prokopy, 1993; Leskey *et al.*, 2005). Virgin males produce grandisoic acid (1*R*,2*S*)-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-cyclobutaneacetic acid (Eller and Bartelt, 1996) which is presumed to be the major component of its aggregation pheromone. Furthermore, PC have also been shown to respond to grandlure, the aggregation pheromone of the boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Tumlinson *et al.*, 1969), in previous tests (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I). Grandlure contains grandisol and Curculionidae species that respond to grandlure usually also produce multiple component pheromones (Eller *et al.*, 1994; Cross *et al.*, 2006; Szendrei *et al.*, 2011; Armstrong, 2010). For example the boll weevil (Tumlinson *et al.*, 1969), the strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi* (Herbst), 1795 (Innocenzi *et al.*, 2001), and the pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano, 1894 (Eller *et al.*, 1994; Adesso and McAuslane, 2009) all produce multiple component pheromones. The various components of these aggregation pheromones have also been shown to be attractive at different concentrations or ratios for the boll weevil (Tumlinson *et al.*, 1969), the pecan weevil *Curculio caryae* Horn, 1873 (Hedin *et al.*, 1997), and the strawberry blossom weevil (Innocenzi *et al.*, 2001). It is thus possible that PC also

produce a multiple component aggregation pheromone with as yet unidentified secondary compounds *e.g.* compounds in addition to the primary component of grandisoic acid, and that attraction to these compounds depends on their concentration (Leskey *et al.*, 2009a, 2009b). The attractant isolated from virgin male PC by Eller and Bartelt (1996) was the optically active, naturally occurring (+) enantiomer of grandisoic acid ((+)GA). However, it should be noted that the synthetic grandisoic acid in the form of a racemic mixture (containing equal amounts of both the (+) and (–) enantiomer) was also found to attract PC in some field studies (Piñero *et al.*, 2001; Piñero and Prokopy, 2003; Leskey *et al.*, 2005). The attractiveness of the individual (+) and (–) enantiomers, however has to date not been evaluated in the field or in laboratory bioassays, with most studies using a synthetic racemic version (Eller and Bartelt, 1996; Leskey *et al.*, 2005; Piñero *et al.*, 2011). Different enantiomers have been shown to elicit different responses in other beetle species (Dickens and Mori, 1989; Tumlinson *et al.*, 1977) and even small amounts of an unnatural enantiomer can be antagonistic in some species (Lindgren *et al.*, 1994). Enantiomeric excess (ee) is a measure of enantiomeric purity of the pheromone enantiomer, which is known to affect the response of weevils like the boll weevil (Dickens and Mori, 1989). Electroantennogram (EAG) studies performed on adult PC using formulations with decreasing amounts of the (–) enantiomer ((–)GA) and increasing amounts of (+)GA have also indicated an increase in the magnitude of response with increasing percent (+)GA (Leskey *et al.*, 2009b).

Despite the quantified attraction provided by grandisoic acid dispensers in the field, consistent trap captures throughout the season using these baits remains unreliable, especially when used as a sole component in baits or after petal fall due to competition from attractive odours in the orchards (Prokopy *et al.*, 2002; Leskey and Wright, 2004). A reliable and efficient method for attracting, aggregating, and retaining PC invading apple orchards has been elusive (Prokopy *et al.*, 2000; Leskey *et al.*, 2008), but progress

has been made by using the trap-tree method of Piñero *et al.* (2011). However captures can still be increased and damage to neighbouring trees reduced if a highly attractive odour could be identified for use as a trap bait. This would also decrease the number of trees and fruit sacrificed in the trap-tree method.

In an attempt to determine which synthetic grandisoic acid enantiomer is most attractive to adult PC and at what concentration, we conducted bioassays in a large upright dual choice still-air olfactometer using both univoltine and multivoltine strains. We tested a synthetic racemic mixture ((±)GA) of grandisoic acid (Eller and Bartelt, 1996) and its two synthetic enantiomers, (+)GA and (−)GA. Different quantities and enantiomeric purities of grandisoic acid were tested in order to determine 1) which enantiomer or mixture is the most attractive or repulsive, 2) the concentration (mg/mL) at which the enantiomer/mixture is most attractive, 3) if the enantiomeric purity (percent ee of (+) vs. (−) enantiomer) has an effect on PC response, 4) if the response between the two strains is similar.

2.4 Materials and Methods

2.4.1 Plum curculio

We used female PC from both strains as per Hock *et al.* (2014 – Chapter I). For univoltine PC, we obtained larvae from infested apples (*Malus* sp.) collected in late June and early July 2009 from unsprayed orchards in Saint-Bruno-de-Montarville, Québec, Canada (45.55028°N, 73.31917°W). We kept infested apples outdoors in the ground in emergence cages. Emerging adults were collected daily and separated by sex (Thompson, 1932) then transferred to overwintering cages (Le Blanc, 1992) and placed

outdoors throughout winter. We removed overwintered adults from cages the following spring, and placed them in 2 L plastic containers in environmentally controlled chambers at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 70% R.H., and 16L:8D (Amis and Snow, 1985). We fed PC immature apples, *Malus pumila*, Borkhausen, 1803 'McIntosh' and given water (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I). A laboratory population of PC was maintained based on the procedure of Hoffmann *et al.* (2007) and augmented annually with wild PC. We obtained multivoltine PC from a laboratory-reared population at the Appalachian Fruit Research Station (Kearneysville, WV, USA) (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I). We held Multivoltine PC under similar conditions as the univoltine PC ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 70% R.H., 16L:8D) (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I). All females used were sexually mature (two-three weeks old), virgin, and unstarved. We conducted experiments during a simulated scotophase, since PC are known to be more active at night (Smith and Flessel, 1968; Racette *et al.*, 1990, 1991; Chouinard *et al.*, 1993).

2.4.2 Olfactometer

We used the same olfactometer as in Hock *et al.* (2014 – Chapter I). We used a large ($\varnothing = 105$ mm inner, 50 mm in height) round Pyrex® glass container (Corning Inc., Corning, New York, USA) with three apical openings ($\varnothing = 24$ mm inner, 60 mm height). The central opening served as a point of introduction for insects into the arena, with a stopper to prevent the PC from leaving after introduction. The two lateral openings were connectors to the jars containing the odour sources and were covered with standard nylon mosquito screening to prevent PC from escaping and reaching the odour sources (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I). We placed a 500 mL standard glass Mason™ jar (Bernardin LTD., Richmond Hill, On., Canada) upside-down on each of the lateral openings on either side of the top of the olfactometer (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I), one side (odour zone) containing the test odour source (*i.e.* synthetic

pheromone) and the other containing the control (air) (Tinzaara *et al.*, 2007; Tafoya *et al.*, 2003; Adesso and McAuslane, 2009). Each jar was secured to the olfactometer using Parafilm®M (Sigma-Aldrich Canada Ltd. Oakville On., Canada).

2.4.3 Experimental conditions

We conducted tests as per Hock *et al.* (2014 – Chapter I) during scotophase (the dark phase in a cycle of light and darkness) in an observation room held at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and 70% R.H. (Smith and Flessel, 1968; Racette *et al.*, 1991; Chouinard *et al.*, 1993). A red filter (LEE Filter, red primary no. 106®, Son-Art Production, Saint-Hyacinthe, Qc, Canada) that allows only wavelengths of 630-800 to pass was used to cover a neon light (40W) that served as the sole source of light during experiments to avoid disturbing PC (Prokopy *et al.*, 1995). We used a still-air setup (Prokopy *et al.*, 1995; Leskey *et al.*, 1996, 2001; Leskey and Prokopy, 2000) since PC are easily disturbed by air (Leskey and Prokopy, 2001; Akotsen-Mensah, 2010). One female was introduced into the olfactometer and left for 30 min, after which its position was noted. Only insects found within a radius of 10 mm or within the tubes leading to the odour jars were used for statistical analysis; other positions were considered as no choice having been made and were disregarded in analysis (Tinzaara *et al.*, 2007; Altuzar *et al.*, 2007; Akotsen-Mensah, 2010; Hock *et al.*, 2014 – Chapter I).

We randomized odor zones after each replicate to limit any bias associated with the environment of the olfactometer. We dismantled the entire olfactometer prior to each new experiment, washed with Sparkleen™ soap (Fisherbrand, Pittsburgh, Penn., USA), rinsed with acetone and hexane (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville On., Canada) to remove any lingering odours prior to the next experiment, and then air-dried

(Ambrogi and Zarbin, 2008; Addesso and McAuslane, 2009; Akotsen-Mensah, 2010; Hock *et al.*, 2014 – Chapter I).

2.4.4 Source material

We kept all synthetic pheromones odours in a freezer at -21°C until use. Synthetic solutions were made by dissolving the granular pheromone in heptane (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA). All test solutions used filled 1.5 mL microcentrifuge tubes (Sigma-Aldrich Inc., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO., USA) and had a cotton wick protruding to allow dispersal of the odour. We then placed the microtube inside a 500 mL Mason jar which was then attached to the olfactometer. Synthetic pheromone volatiles used in this study included (+)GA and (–)GA, as well as (±)GA.

We obtained (±)GA and its enantiomers from the University of Quebec at Chicoutimi (Qc., Canada). We separated the enantiomers of (±)GA as per Hock *et al.* (2014 – Chapter I) according to the methods described below.

2.4.5 Procedure for oxidation of racemic grandisol

Grandisoic acid was prepared by sequential oxidation of grandisol, the active ingredient of commercial grandlure (Bedoukian Research, USA). N-methylmorpholine (NMO, 3400 mg, 29.0 mmol) was added to a dried solution of 2240 mg of grandisol (14.5 mmol) in methylene chloride (CH_2Cl_2 , 25 mL). We chilled the mixture with ice water, after which the catalytic amount of tetrapropylammonium perruthenate (TPAP, 255 mg, 0.726 mmol) was added to a dried solution of grandisol CH_2Cl_2 . We stirred the

mixture for 60 min at room temperature or until the reaction was complete, as shown by using thin-layer chromatography (TLC). We then evaporated the solution under reduced pressure to give a black oily residue (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I).

The second oxidation step was conducted by dissolving crude grandisal in a mixture of t-butanol (30 mL), water (5 mL) and 2-methyl-2-butene (31 mL). The mixture was chilled to 0°C. We added an aqueous solution (20 mL) containing sodium chlorite (2360 g, 26.1 mmol) and monosodium phosphate (3800 mg, 27.6 mmol) drop-wise over a period of 10 min. We vigorously agitated the mixture for a period of 30 min. Work-up was performed by evaporating the solvent and adding 50 mL of NaOH₂N. We washed the mixture with CH₂Cl₂ (four × 50 mL). The aqueous phase was acidified with aq. HCl 10% to pH four. We extracted the product with CH₂Cl₂ (five × 50 mL) and dried it with MgSO₄ (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I).

Enantiomeric purification was performed by co-crystallisation of grandisoic acid. One gram of grandisoic acid was dissolved in hot ethanol-water mixture (50:50) and 965 mg of quinine was added. We allowed the solution to chill in a cold room (-18°C) for 24 h. The crystals obtained were filtered and re-crystallized three other times in a hot ethanol-water mixture (50:50). We combined the mother liquors each time. After four re-crystallization steps, the solid was dissolved in CH₂Cl₂ and (-)GA was extracted with NaHCO₃. We washed the aqueous layer with CH₂Cl₂ and neutralized with aq. HCl 10%, which precipitates grandisoic acid. The latter was extracted with CH₂Cl₂, dried with MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The mixture was acidified with aq. HCl 10% and grandisoic acid was extracted with CH₂Cl₂. The organic phase was washed with aq. HCl 10%, dried with MgSO₄ and evaporated under reduced pressure (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I).

The optical rotation of the pure enantiomer is 47.9° , and the optical rotation obtained herein was $+34^\circ$ and $+24.7^\circ$ for the (+)-enantiomer, which results in an ee of 72% and 51.6% (+)GA respectively. The optical rotation was -32° for the (–)-enantiomer, resulting in an ee of 66.8% (–)GA. The optical rotation of a racemic mixture is 0° with a resulting ee of 0% (+)GA (50:50 ratio of both enantiomers).

2.4.6 Pheromone mixtures and concentrations at different enantiomeric purities

We chose a range of concentrations and purities in order to determine the optimal concentration and purity to which the PC would give the greatest response. Depending on how well the enantiomers of grandisoic acid can be separated, each solution has a different ratio of enantiomeric purity of these enantiomers. Attempting to purify (\pm)GA into only (+)GA usually leads to small quantities (g) of the purified enantiomer, and always with at least a small percent of (–)GA present as well (*e.g.* a mixture of 72% ee (+)GA will actually contain 86% (+)GA, but will also contain 14% (–)GA). To see if PC responded differently to different purities of (+)GA, the following purities were tested for both strains: 66.8% ee (–)GA, 0% (+)GA (*i.e.* (\pm)GA), 51.6% ee (+)GA, and 72% ee (+)GA. Concentrations were chosen based on previous tests done in our laboratory. While an attempt was made to ensure similar concentrations were tested between strains, the limited amount of grandisoic acid enantiomers available at the same purities occasionally resulted in unequal numbers of concentrations being tested. We began tests with the highest purity of (+)GA, since this is believed to be the synthetic version that most closely resembles the natural pheromone emitted by male PC. For univoltine females, vials of 1.5 mL with concentrations of 2×10^{-3} , 2×10^{-6} , 2×10^{-7} , 2×10^{-8} , 2×10^{-9} , and 2×10^{-10} mg/mL of (+)GA (72% ee) in a heptane solvent were used as test solutions, and for multivoltine females concentrations of 2×10^{-6} , 2×10^{-7} , 2×10^{-8} , 2×10^{-9} , and 2×10^{-10} mg/mL of (+)GA (72%) were used (Table 2.1).

Based on the results of this experiment, tests using the most attractive concentration found for both strains (2×10^{-7} mg/mL for univoltine females, 2×10^{-9} mg/mL for multivoltine females) were also tested using a (+)GA solution with a lower enantiomeric purity of 51.6% (+)GA in order to see if the purity of solution (% ee (+)GA) would affect PC response. In addition, vials of 1.5 mL of (–)GA at 66.8% ee, at concentrations of 20, 2, 0.2, and 2×10^{-7} mg/mL were tested for univoltine PC for possible repulsive effects. For multivoltine females only the 2×10^{-7} mg/mL concentration was tested (due to low (–)GA amounts available). The (±)GA mixture was tested at concentrations of 2×10^{-7} mg/mL and 4×10^{-7} mg/mL for univoltine PC, and 2×10^{-9} mg/mL and 4×10^{-9} mg/mL multivoltine (Table 2.1). These concentrations were chosen based on the results of the experiments using (+)GA, since we wished to determine if the same concentrations or higher concentrations found attractive to PC using (+)GA would also be attractive using (±)GA. All concentrations were tested against the control.

The average number of replicates was 17, however occasionally replicate number was higher or lower (range 9–41). This is because there were occasional deaths of PC during rearing, and because not all PC responded during trials (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I).

2.4.7 Statistical analysis

We used SPSS statistical software (SPSS Inc., 2006, Chicago, Illinois to analyze all data as per Hock *et al.* (2014 – Chapter I). Comparisons between test and control odour choices were analyzed using a χ^2 test ($P = 0.05$), a Yates continuity correction was applied when necessary (Siegel and Castellan, 1988). Comparisons between two or more experiments or trials were also done using a χ^2 test ($P = 0.05$), if a significant

difference was found a χ^2 test with a Bonferroni correction (Shaffer, 1995) was conducted in order to determine which groups were significantly different from each other ($P = 0.008$).

2.5 Results

At the 72% ee (+)GA purity, there was a significant difference only for the relatively intermediate concentration of 2×10^{-7} mg/mL ($\chi^2=4.571$, $df=1$, $P=0.033$), with more females responding to this concentration than the control (Fig. 2.1A). None of the other concentrations were found to be significantly attractive when compared to the control (2×10^{-3} mg/mL: $\chi^2=0.091$, $df=1$, $P=0.763$; 2×10^{-6} mg/mL: $\chi^2=1.600$, $df=1$, $P=0.206$; 2×10^{-8} mg/mL: $\chi^2=0.818$, $df=1$, $P=0.366$, 2×10^{-9} mg/mL: $\chi^2=0.889$, $df=1$, $P=0.346$; 2×10^{-10} mg/mL: $\chi^2=0.059$, $df=1$, $P=0.808$) (Table 2.1).

For the multivoltine strain, there was only a difference in response for the 2×10^{-9} mg/mL concentration vs. control ($\chi^2=6.638$, $df=1$, $P=0.012$), with this concentration proving more attractive than the control (Fig. 2.1B). There was no significant difference for any of the other concentrations between test and control odours (2×10^{-6} mg/mL: $\chi^2=0.200$, $df=1$, $P=0.655$; 2×10^{-7} : $\chi^2=0.610$, $df=1$, $P=0.435$, 2×10^{-8} : $\chi^2=0.250$, $df=1$, $P=0.617$; 2×10^{-10} : $\chi^2=0.529$, $df=4$, $P=0.467$) (Table 2.1).

For 51.6% ee (+)GA, univoltine females gave no significant difference between response to 2×10^{-7} mg/mL (+)GA at 51.6% ee and the control ($\chi^2=1.000$, $df=1$, $P=0.317$) (Fig. 2.2A). The same held true for the multivoltine strain, with no difference in response between 2×10^{-9} mg/mL at 51.6% ee vs. the control ($\chi^2=2.882$, $df=1$, $P=0.090$) (Fig. 2.2B).

For 66.8% ee (-)GA univoltine females had no significant difference in response to the 20 mg/mL ($\chi^2=2.000$, $df=1$, $P=0.157$), or the 2 mg/mL ($\chi^2=0.053$, $df=1$, $P=0.819$) concentrations of (-)GA at 66.8% ee *vs.* the control (Table 2.1). However, there was a significant repulsion to the lower concentrations of 0.2 mg/mL ($\chi^2=5.400$, $df=1$, $P=0.020$) and 2×10^{-7} mg/mL ($\chi^2=4.000$, $df=1$, $P=0.045$), with more females choosing the control in both cases. For multivoltine females there was no significant difference in response between 2×10^{-9} mg/mL (-)GA at 66.8% ee and the control ($\chi^2=0.059$, $df=1$, $P=0.808$) (Fig. 2.2B).

There was no significant difference in response between any of the (\pm)GA concentrations tested *vs.* the control for univoltine females (2×10^{-7} mg/mL: $\chi^2=0.333$, $df=1$, $P=0.564$; 4×10^{-7} mg/mL: $\chi^2=0.400$, $df=1$, $P=0.527$). The results were the same regarding multivoltine females for both concentrations of (\pm)GA, with no significant difference between test and the control (2×10^{-9} mg/mL: $\chi^2=2.882$, $df=1$, $P=0.090$; 4×10^{-9} mg/mL: $\chi^2=0.000$, $df=1$, $P=1.000$) (Table 2.1).

When comparing the different enantiomeric purities of (+)GA, univoltine females showed a steady decrease in response from the purest solution of (+)GA (72% ee) to the solution with the least amount of (+)GA *e.g.* 66.8% ee -GA, with a significant difference in response between purities ($\chi^2=7.997$, $df=3$, $P=0.046$). The 72% ee (+)GA significantly differed from the 66.8% ee (-)GA ($\chi^2=7.471$, $df=1$, $P=0.006$), but not to the intermediate purities of (+)GA (51.6% ee (+)GA: $\chi^2=0.312$, $df=1$, $P=0.576$; (\pm)GA (0% ee): $\chi^2=2.322$, $df=1$, $P=0.127$) (Fig. 2.2A). For multivoltine females the situation was similar, with more females responding to the highest enantiomeric purity (72% ee) at a concentration of 2×10^{-9} mg/mL (+)GA than any other purity. There was a significant difference when comparing purities ($\chi^2=12.003$, $df=3$, $P=0.007$), with the 72% ee differing from all others (51.6% ee (+)GA: $\chi^2=8.916$, $df=1$, $P=0.003$; (\pm)GA

(0% ee): $\chi^2=8.916$, $df=1$, $P=0.003$) except the 66.8% (–)GA purity ($\chi^2=3.955$, $df=1$, $P=0.047$) (Fig. 2.2B).

2.6 Discussion

The most attractive enantiomer was (+)GA, but both strains did not prefer the same concentration of this enantiomer (2×10^{-7} mg/mL at 72% ee for univoltine females, and 2×10^{-9} mg/mL at 72% ee for multivoltine females). This suggests that PC response to (+)GA is dependent on the concentration, but also the enantiomeric purity, of this synthetic enantiomer since 51.6% ee (+)GA did not attract females. The two strains seem to respond to the same high enantiomeric purity (72% ee) of (+)GA. Differences in pheromone response of different weevil strains have previously been reported for PC (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I) and for other insects (Fletcher *et al.*, 1968; Messina and Dickinson, 1993). Different responses to varying concentrations of pheromone components between strains may serve as an adaptive advantage in areas where PC strains overlap, since univoltine and multivoltine PC cannot produce viable offspring when intermating (Padula and Smith, 1971; Zhang and Pfeiffer, 2008; Zhang *et al.*, 2010). Concentration-dependent responses from PCs have been reported for synthetic lures (Prokopy *et al.*, 2004; Hock *et al.*, 2014 – Chapter I), as well as for conspecifics (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I) where the attraction of females to two males was significantly greater than to one or five males for both PC strains. This situation is similar to the concentration-dependent responses that are seen in other beetles, such as the cigarette beetle, *Lasiderma serricornis* (Fabricius) 1792 (Coleoptera: Anobiidae) (Coffelt and Burkolder, 1972), the boll weevil, *A. grandis* (Hardee *et al.*, 1974), and the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier, 1790 (Coleoptera: Curculionidae) (Hallett *et al.*, 1999). Since both strains of PC were attracted to the odour of two males (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I), it is possible that two males emit

the most attractive concentration of pheromone (Hock *et al.*, 2014– Chapter I) which may be similar to the concentrations of (+)GA found herein. However, it should be noted that any pheromones produced naturally by males would include the complete pheromone blend, and not just one component as was tested in our current experiments. Akotsen-Mensah (2010) also noted that PC did not respond to grandisoic acid pheromone lures containing the sole pheromone component, synthetic (\pm)GA, in his olfactometer trials. Therefore, differences in attraction between strains due to concentrations when testing the (complete) natural pheromone may be less apparent than when testing a single synthetic pheromone component (*i.e.* (+)GA), and it is very likely that PC produce a multi-component pheromone (Leskey *et al.*, 2009a, 2009b), as was noted for other weevil species such as the boll weevil (Tumlinson *et al.*, 1969), the pepper weevil (Eller *et al.*, 1994), and strawberry blossom weevil (Innocenzi *et al.*, 2001). The attraction of females to a single pheromone compound would be expected to differ from that of the complete pheromone blend that is produced naturally by males. However, even PC response to a single component of its aggregation pheromone can be, and has been, proven to be useful in developing monitoring strategies (Leskey *et al.*, 2014 – see Annexe B). The fact that the two strains of PC respond to different concentrations of (+)GA may also influence the type of pheromones employed in baits based on the region where the particular strain is found (*i.e.* northern regions for univoltine PC and more southern regions for multivoltine PC, and a combination of baits where PC overlap – *i.e.* Virginia State).

Enantiomeric purity can be of importance if a synthetic form of grandisoic acid is to be used as an attractant for PC since neither (\pm)GA, which contains both (+)GA and (–)GA in equal amounts, nor (–)GA or the (+)GA with the lower enantiomeric purity (55.6% ee) were found to be significantly attractive to PC in our olfactometric studies at the concentrations tested. Comparing the response of females of both strains to different purities of (+)GA revealed a significant attractive response only for the 72%

ee (+)GA. Enantiomeric purity has been shown to affect the response of other weevils, for example, the (–)- and (±)-grandisol were both found to elicit much weaker EAG responses than (+)-grandisol in the boll weevil, with (–)-grandisol having a tendency to inhibit responses to (+)-grandisol (Dickens and Mori, 1989). Males of the strawberry blossom weevil produce only the (+) or *R*-enantiomer of lavandulol, but the *S*-enantiomer has been found not to be significantly repulsive, and the racemic mixture was found to be equally attractive (Cross *et al.*, 2006). Test concentrations of 1.0 and 10 mg/mL (+)GA elicit significant responses from PC in EAG studies (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I), and studies of adult PC using formulations with increasing amounts of (+)GA (and conversely decreasing amounts of (–)GA) have also shown an increase in the level of EAG responses (Leskey *et al.*, 2009b). As only the (+) enantiomer is emitted naturally by male PC, the general unattractiveness of the synthetic (–)GA as well as the lack of attraction to synthetic (±)GA in olfactometric experiments at the concentrations tested may be explained by this, *i.e.* (+)GA is the natural enantiomer and PC will respond primarily to (+)GA.

This could also explain the difficulty in observing consistent long-term attraction in the field when solely grandisoic acid dispensers (using a standard formulation of (±)GA) are employed without any host-plant volatiles to augment PC response (Piñero and Prokopy 2003; Prokopy *et al.*, 2003; Leskey *et al.*, 2005). At a given concentration, the amount of (+)GA present in a racemic mixture may not be enough to significantly attract PC. Additionally, increasing the amount of grandisoic acid in lures (racemic mixture) does not necessarily increase attraction, as noted in field studies by Prokopy *et al.* (2004), Leskey and Zhang (2007), and Leskey *et al.* (2014 – see Annexe B). Previous studies have shown that in the laboratory, females are attracted to low amounts (0.003 mg per rubber septum) of (±)GA (Leskey and Prokopy, 2001), while a high amount of 3.00 mg (per rubber septum) was less attractive to females. Field studies using twice the amount of grandisoic acid (2 mg/day) present in lures also resulted in

no increase in attraction (Prokopy *et al.*, 2004). This could be due to the fact that increasing the overall amount of the lure results in a respective increase in amount of both (+)GA and (-)GA present in the mixture. Our results regarding (-)GA indicate that even small concentrations (-)GA at high purities (66.8% ee) may have an antagonistic or repellent effect on both multivoltine and univoltine females especially since a greater number of univoltine females chose the control over 2×10^{-7} mg/mL (and 0.2 mg/mL) of (-)GA (Fig. 2.2A). Akotsen-Mensah (2010) found no attraction of males or females to grandisoic acid lures (25 mg lures with a release rate of 0.04 mg/hour) either alone or in conjunction with other lures (*e.g.* benzaldehyde, plum essence) in his behavioural tests, even though these same lures were attractive in his field tests. We would expect PC to respond in a similar fashion in laboratory experiments as they would in the field, however it is likely that differences between experimental conditions (*i.e.* release rate of the lures *vs.* that of vials, volatiles present in nearby host fruit within orchards, physiological status of wild *vs.* lab-reared insects, *etc.*) are behind the differences noted between trials (Akotsen-Mensah, 2010). It is also possible that at low concentrations of (\pm)GA, the amount of (+)GA present in the mixture may not be enough to significantly attract PC, while at very high concentrations the amount of (+)GA present may be offset by the antagonistic effects of (-)GA. Inhibition of response of beetles by small amounts of the unnatural isomer is also seen in field bioassays of the Japanese beetle *Popillia japonica* Newman, 1841 (Tumlinson *et al.*, 1977). Thus PC are similar to other beetles in that concentration of individual pheromone components is a key factor in behavioural responses.

Currently, the use of (\pm)GA in combination with benzaldehyde is sufficient to attract PC activity in the field, at least for part of the season in apple orchards (Piñero and Prokopy, 2003; Leskey *et al.*, 2005, 2008; Piñero *et al.*, 2011). However more research is needed to establish an active space for a given pheromonal bait that will limit PC activity to traps or trap-trees and diminish the damage to neighbouring 'non-baited'

trap trees. Laboratory olfactometric studies have been proven to be extremely helpful in the past when identifying volatiles attractive to insects and have been instrumental in developing monitoring and control strategies (Hardee *et al.*, 1974; Dickens, 1986; Leskey and Prokopy, 2001). Nonetheless, some fine-tuning between laboratory and field trials is often necessary. Our results can be used in field trials to further enhance the attraction of PC to pheromone lures. For example, baits containing high enantiomeric purities (72% or higher) of (+)GA at a range of concentrations starting with the most attractive at 2×10^{-7} mg/mL (for univoltine PC) and 2×10^{-9} mg/m (for multivoltine PC) alone or along with other attractive host-plant volatiles *i.e.* plum essence (Akotsen-Mensah, 2010) may increase trap captures. Trap baits with (+)GA can also possibly be employed in conjunction with benzaldehyde lures to see if trap captures would increase. On the other hand, tests with high enantiomeric purities of (–)GA can also be attempted in order to determine the role of this enantiomer in the field as a possible repellent, pushing PC away from non-baited trees in a push-pull strategy (Leskey *et al.*, 2014 – see Annexe B). The use of pheromone traps can also be integrated with other control strategies, such as in the deployment of attract and kill traps (Leskey *et al.*, 2005) and the use of entomopathogenic nematodes (Shapiro-Ilan *et al.*, 2008). For example, applying nematodes to the soil under areas where pheromone traps have been placed to attract adults would have the added effect of ensuring that any larvae of the survivors could then be preyed upon by these nematodes, adding an additional level of control (Leskey *et al.*, 2014 – see Annexe B). However, due to the difficulty in collecting pheromone samples, full analysis and quantification of the pheromone produced by PC remains to be completed, inhibiting rapid progress in finding more attractive and complete pheromone combinations.

2.7 Acknowledgements

We would like to thank Sylvie Bellerose and Franz Vanoosthuyse for their assistance in the laboratory and the field. These studies were supported by a grant from Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire de MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Québec, Qc.), and in part by grant # 2009-51181-06005 from USDA-NIFA Specialty Crops Research Initiative.

2.8 Bibliography

- ADDESSO, K.M., et H.J. MCAUSLANE (2009). Pepper Weevil attraction to volatiles from host and nonhost plants. *Environ. Entomol.* 38: 216-224.
- AKOTSEN-MENSAH, C. (2010). *Ecology and management of plum curculio, Conotrachelus nenuphar (Coleoptera: Curculionidae) in Alabama Peaches*. Mémoire de Doctorat, Auburn University, Alabama, USA. 180 p.
- ALTUZAR, A., E.A. MALO, H. GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ et J.C. ROJAS (2007). Electrophysiological and behavioural responses of *Scyphophorus acupunctatus* (Col., Curculionidae) to Agave tequilana volatiles. *J. Appl. Entomol.* 131(2): 121–127.
- AMBROGI, B. G., et P.H.G. ZARBIN (2008). Aggregation pheromone in *Sternechus subsignatus* (Coleoptera: Curculionidae): Olfactory behaviour and temporal pattern of emission. *J. Appl. Entomol.* 132: 54–58.
- AMIS, A., et J.J. SNOW (1985). « *Conotrachelus nenuphar* ». P. Singh et R. F. Moore, (éds.), *Handbook of Insect Rearing*, Vol. 1. New York, Elsevier Science Publishing, p. 227-236.
- ARMSTRONG, J.S. (2010). Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae) Response to and volatilization rates of grandlure when combined with varying doses of Eugenol in the extended-life pheromone lure. *J. Econ. Entomol.* 103(2): 356-359.
- BERNAYS, E.A., et R.F. CHAPMAN (1994). Host-plant selection by phytophagous insects. New York, Chapman and Hall Inc., 312p.
- BUTKEWICH, S.L., et R.J. PROKOPY (1993). The effect of short-range host odor stimuli on host fruit finding and feeding behavior of plum curculio adults. *J. Chem. Ecol.* 19: 825-835.
- BUTKEWICH, S.L., R.J. PROKOPY et T.A. GREEN (1987). Discrimination of occupied host fruit by plum curculio females (Coleoptera: Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* 13(8): 1833-1841.
- CHOUINARD G., S.B. HILL et C. VINCENT (1993). Spring behavior of the plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) within caged dwarf apple trees. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 86: 333–340.

- COFFELT, J.A., et W.E. BURKHOLDER (1972). Reproductive biology of the cigarette beetle *Lasioderma serricorne*. 1. Quantitative laboratory bioassay of the female sex pheromone from females of different ages. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 65: 447-450.
- CROSS J.V., H. HESKETH, C.N. JAY, D.R. HALL, P.J. INNOCENZI, D.I. FARMAN et C.M. BURGESS (2006). Exploiting the aggregation pheromone of strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi* Herbst (Coleoptera: Curculionidae): Part 1. Development of lure and trap. *Crop Prot.* 25: 144-154.
- DICKENS, J.C. (1986). Orientation of boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae) to pheromone and volatile host compound in the laboratory. *J. Chem. Ecol.* 12: 91-98.
- DICKENS, J.C., et K. MORI (1989). Receptor chirality and behavioral specificity of the boll weevil, *Anthonomus grandis* Both. (Coleoptera: Curculionidae), for its pheromone, (+)-grandisol. *J. Chem. Ecol.* 15:517-528.
- ELLER, F.J., et R.J. BARTELT (1996). Grandisoic acid a male produced aggregation pheromone from the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*. *J. Nat. Prod.* 59: 451-453.
- ELLER, F.J., R.J. BARTELT, B.S. SHASHA, D.J. SCHUSTER, D.G. RILEY, P.A. STANSLY, T.F. MUELLER, K.D. SHULER, B. JOHNSON, J.H. DAVIS et C.A. SUTHERLAND (1994). Aggregation pheromone for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): identification and field activity. *J. Chem. Ecol.* 20(7): 1537-1555.
- FLETCHER, L.W., H.V. CLABORN, J.P. TURNER et E. LOPEZ (1968). Difference in response of two strains of screw-worm flies to the male pheromone. *J. Econ. Entomol.* 61(5): 1386-1388.
- HALLETT, R.H., A.C. OEHLISCHLAGER et J.B. BORDEN (1999). Pheromone trapping protocols for the Asian palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Intern. J. Pest Manag.* 45: 231-237.
- HARDEE, D.D., G.H. MCKIBBEN, D.R. RUMMEL, P.M. HUDDLESTON et J.R. COPPEDGE (1974). Response of boll weevils to component ratios and doses of the pheromone, grandlure. *Environ. Entomol.* 3: 135-138.

- HEDIN, P.A., D.A. DOLLAR, J.K. COLLINS, J.G. DUBOIS, P.G. MULDER, G.H. HEDIN, M.W. SIMTH et R.D. EUCRENBARY (1997). Identification on of male pecan weevil pheromone. *J. Chem. Ecol.* 23: 965-977.
- HOCK, V., G. CHOUINARD, É. LUCAS et D CORMIER, T. LESKEY, S. WRIGHT, A. ZHANG et A. PICHETTE (2014). Establishing abiotic and biotic factors necessary for reliable male pheromone production and attraction to pheromones by female plum curculios *conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Can. Entomol. Can. Entomol.* 146: 528-547.
- HOFFMANN, E.J., J. VANDERJAGT et M.E. WHALON (2007). Pyriproxyfen reproduction in prediapause northern strain plum curculio (*Conotrachelus nenuphar* Herbst). *Pest Manag. Sci.* 63: 835-840.
- INNOCENZI, P.J., D.R. HALL et J.V. CROSS (2001). Components of male aggregation pheromone of strawberry blossom weevil, *Anthonomus rubi* Herbst. (Coleoptera: Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* 27(6): 203-1218.
- LE BLANC, J.P.R. (1992). *Trapping and monitoring techniques for plum curculio, Conotrachelus nenuphar* (Herbst), (Coleoptera: Curculionidae) in a southwestern Quebec apple orchard. Mémoire de Doctorat. McGill University, Quebec, Canada.
- LESKEY, T.C., et R.J. PROKOPY (2000). Sources of apple odour attractive to adult plum curculios. *J. Chem. Ecol.* 26(3): 639-653.
- LESKEY, T.C., et R.J. PROKOPY (2001). Adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) attraction to fruit and conspecific odors. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 275-288.
- LESKEY, T.C., et S. WRIGHT (2004). Monitoring plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae), population in apple and peach orchards in the Mid-Atlantic. *J. Econ. Entomol.* 97(1): 79-88.
- LESKEY, T.C., et A. ZHANG (2007). Impact of Temperature on Plum Curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) Responses to Odor-Baited Traps. *J. Econ. Entomol.* 100: 343-349.
- LESKEY, T.C., C. BRAMLAGE, L. PHELAN et R.J. PROKOPY (1996). Attraction of plum curculio adults to host-plant and pheromonal extracts. *Fruit Notes.* 61(1): 7-9.

- LESKEY, T.C., R.J. PROKOPY, S. WRIGHT, P.L. PHELAN et L. W. HAYNES. (2001). Evaluation of individual components of plum odor as potential attractants for adult plum curculios. *J. Chem. Ecol.* 27(1): 1-17.
- LESKEY, T.C., A.J. ZHANG et M. HERZOG (2005). Nonfruiting host tree volatile blends: Novel attractants for the plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 34(4): 785-793.
- LESKEY, T.C., J.C. PIÑERO, S. WOOD et R.J. PROKOPY (2008). Odor baited trap trees: a potential management tool for the plum curculio. *J. Econ. Entomol.* 101: 1302-1309.
- LESKEY, T.C., G. CHOUINARD et C. VINCENT (2009a). « Monitoring and management of the apple maggot fly and the plum curculio: honoring the legacy of R.J. Prokopy ». M. Aluja, T.C. Leskey et C. Vincent (éds.), *Biorational Tree Fruit Pest Management*. UK, Wallingford, Oxon, CABI Publishing; 2009. p. 110-144.
- LESKEY, T.C., S. WRIGHT, W. ANGER, G. CHOUINARD, D. CORMIER, A. PICHETTE et A. ZHANG (2009b). Electroantennogram technique for *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 38(3): 870-878.
- LESKEY, T.C., S.E. WRIGHT, V. HOCK, G. CHOUINARD, D. CORMIER, K. LEAHY, D. COOLEY, A. TUTTLE, A. EATON et A. ZHANG (2014). Evaluating electrophysiological and behavioral responses to volatiles for improvement of odor-baited trap-tree management of *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 43(3): 753-761.
- LINDGREN, B.S., J.H. BORDEN, M. GNATOWSKI, P.C. WONG, et M.D. MCGREGOR (1994). Method and composition for controlling mountain pine beetles. U.S. patent 5,281,418 January 25.
- MESSINA, F.J., et J.A. DICKINSON (1993). Egg-laying behavior in divergent strains of the cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae): time budgets and transition matrices. *Annals Entomol Soc. Amer.* 86(2): 207-214.
- PADULA, A.L., et E.H. SMITH (1971). Reproductive incompatibility between univoltine males and multivoltine females of the plum curculio. *Ann. Soc. Entomol. Am.* 64: 665-668.
- PIÑERO, J., et R.J. PROKOPY (2003). Field evaluation of plant odour and pheromonal combinations for attracting plum curculios. *J. Chem. Ecol.* 29: 2735-2748.

- PIÑERO, J.C., S. WRIGHT et R.J. PROKOPY (2001). Response of plum Curculio (Coleoptera: Curculionidae) to odor-baited traps near woods. *J. Econ. Entomol.* 94(6): 1386-1397.
- PIÑERO J.C., A.M. AGNELLO, A. TUTTLE, T.C. LESKEY, H. FAUBERT, G. KOEHLER, L. LOS, G. MORIN, K. LEAHY, D.R. COOLEY et R.J. PROKOPY (2011). Effectiveness of odor-baited trap trees for plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) monitoring in commercial apple orchards in the Northeast. *J. Econ. Entomol.* 104: 1613-1621.
- PROKOPY, R.J., S.S. COOLEY et P.L. PHELAN (1995). Bioassay approaches to assessing behavioral responses of plum curculio adults (Coleoptera: Curculionidae) to host fruit odor. *J. Chem. Ecol.* 21(8): 1073-1084.
- PROKOPY, R.J., B.W. CHANDLER, T.C. LESKEY et S. WRIGHT (2000). Comparison of six different types of unbaited traps for monitoring plum curculio in orchard. *J. Entomol. Sci.* 35: 411-421.
- PROKOPY, R.J., B.W. CHANDLER et J.C. PIÑERO (2002). Commercial orchard evaluation of traps for monitoring plum curculio: 2001 results. *Fruit Notes.* 67: 17-22.
- PROKOPY, R.J., B.W. CHANDLER, S.A. DYNOK et J. PIÑERO (2003). Odor-baited trees: a new approach to monitoring plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 96: 826-834.
- PROKOPY, R.J., I. JACOME, E. GRAY, G. TRUJILLO, M. RICCI et J.C. PIÑERO (2004). Using odor-baited trap trees as sentinels to monitor plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in apple orchards. *J. Econ. Entomol.* 97: 511-517.
- RACETTE, G., S.B. HILL, et C. VINCENT (1990). Actographs for recording daily activity of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 83(6): 2385-2392.
- RACETTE, G., G. CHOUINARD, S.B. HILL et C. VINCENT (1991). Activity of adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) on apple trees in spring. *J. Econ. Entomol.* 84: 1827-1832.
- RACETTE, G., G. CHOUINARD, C. VINCENT, et S.B. HILL (1992). Ecology and management of plum curculio, *Conotrachelus nemuphar* (Coleoptera: Curculionidae), in apple orchards. *Phyto.* 73: 85-100.

- SHAPIRO-ILAN, D.I., R.F. III MIZELL, T.E. COTTRELL et D.L. HORTON (2008). Control of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, with entomopathogenic nematodes: Effects of application timing, alternate host plant, and nematode strain. *Biol. Cont.* 44: 207-215.
- SHAFFER, J.P. (1995). Multiple hypothesis testing. *Ann. Rev. Psy.* 46: 561-584.
- SIEGEL, S. et N.J. CASTELLAN (1988). *Nonparametric statistics for the behavioural sciences*. 2nd Edition, New York: McGraw-Hill, 399 p.
- SMITH, E.H., et J.K. FLESSEL (1968). Hibernation of the plum curculio and its spring migration to host trees. *J. Econ. Entomol.* 61(1): 193-203.
- SZENDREI, Z., A. AVERILL, H. ALBORN et C. RODRIGUEZ-SAONA (2011). Identification and field evaluation of attractants for the cranberry weevil, *Anthonomus musculus* Say. *J. Chem. Ecol.* 37: 387-397.
- TAFOYA, F., J. LOPEZ-COLLADO, D. STANLEY, J. ROJAS et J. CIBRIÁN-TOVAR (2003). Evidence of an aggregation pheromone in males of the cactus weevil *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 32(3): 484-487.
- THOMPSON, J.R. (1932). Sex differentiation of adults of *Conotrachelus nenuphar*. *J. Econ. Entomol.* 25: 807-810.
- TINZAARA, W., C.S. GOLD, M. DICKE, A.V. HUIS et P.E. RAGAMA (2007). Host plant odours enhance the responses of adult banana weevil to the synthetic aggregation pheromone cosmolure®. *Inter. J. Pest Manage.* 53(2): 127-137.
- TUMLINSON, J.H., D.D. HARDEE, R.C. GUELDNER, A.C. THOMPSON, P.A. HEDIN et J.P. MINYARD (1969). Sex pheromones produced by male boll weevil: isolation, identification, and synthesis. *Sci.* 166: 1010-1012.
- TUMLINSON, J.H., M.G. KLEIN, R.E. DOOLITTLE, T.L. LADD et A.T. PROVEAUX (1977). Identification of the female Japanese beetle sex pheromone: inhibition of male response by an enantiomer. *Sci.* 197: 789-792.
- VINCENT, C., et M. ROY (1992). Entomological limits to biological control programs in Québec apple orchards. *Acta. Phytopathol. Entomol. Hung.* 27: 649-657.

ZHANG, X., et D.G. PFEIFFER (2008). Evaluation of reproductive compatibility of interstrain matings among plum curculio populations in the eastern United States. *Envir. Entomol.* 37(5): 1208-1213.

ZHANG, X., S. LUCKHART, Z. TU et D.G. PFEIFFER (2010). Analysis of *Wolbachia* strains associated with *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) in the Eastern United States. *Environ. Entomol.* 39(2): 396-405.

Table 2.1 Female response to different enantiomeric purities and concentrations of grandisoic acid

Strain	Mixture	Concentration (mg/mL)	% Purity (ee)	χ^2	P	df	Response
Univoltine	(+)GA	2×10^{-3}	72.0	0.091	0.763	1	Neutral
	(+)GA	2×10^{-6}	72.0	1.600	0.206	1	Neutral
	(+)GA	2×10^{-7}	72.0	4.571	0.033	1	Attractive
	(+)GA	2×10^{-8}	72.0	0.818	0.366	1	Neutral
	(+)GA	2×10^{-9}	72.0	0.889	0.346	1	Neutral
	(+)GA	2×10^{-10}	72.0	0.059	0.808	1	Neutral
	(+)GA	2×10^{-7}	51.6	1.000	0.317	1	Neutral
	(-)GA	20	66.8	2.000	0.157	1	Neutral
	(-)GA	2.0	66.8	0.053	0.819	1	Neutral
	(-)GA	0.2	66.8	5.400	0.020	1	Repulsive
	(-)GA	2×10^{-7}	66.8	4.000	0.045	1	Repulsive
	(±)GA	2×10^{-7}	0	0.333	0.564	1	Neutral
	(±)GA	4×10^{-7}	0	0.400	0.527	1	Neutral
Multivoltine	(+)GA	2×10^{-6}	72.0	0.200	0.655	1	Neutral
	(+)GA	2×10^{-7}	72.0	0.610	0.435	1	Neutral
	(+)GA	2×10^{-8}	72.0	0.250	0.617	1	Neutral
	(+)GA	2×10^{-9}	72.0	6.638	0.012	1	Attractive
	(+)GA	2×10^{-10}	72.0	0.529	0.467	1	Neutral
	(+)GA	2×10^{-9}	51.6	2.882	0.090	1	Neutral
	(-)GA	2×10^{-9}	66.8	0.059	0.808	1	Neutral
	(±)GA	2×10^{-9}	0	2.882	0.090	1	Neutral
	(±)GA	4×10^{-9}	0	0.000	1.000	1	Neutral

Different concentrations and purities (ee) of the (+) enantiomer ((+)GA), the (-) enantiomer ((-)GA), and the racemic mixture ((±)GA) of grandisoic acid tested on univoltine and multivoltine females. Chi-square (χ^2), significance (P), and degrees of freedom (df) are given for a level of significance of $\alpha = 0.05$. ee = enantiomeric excess.

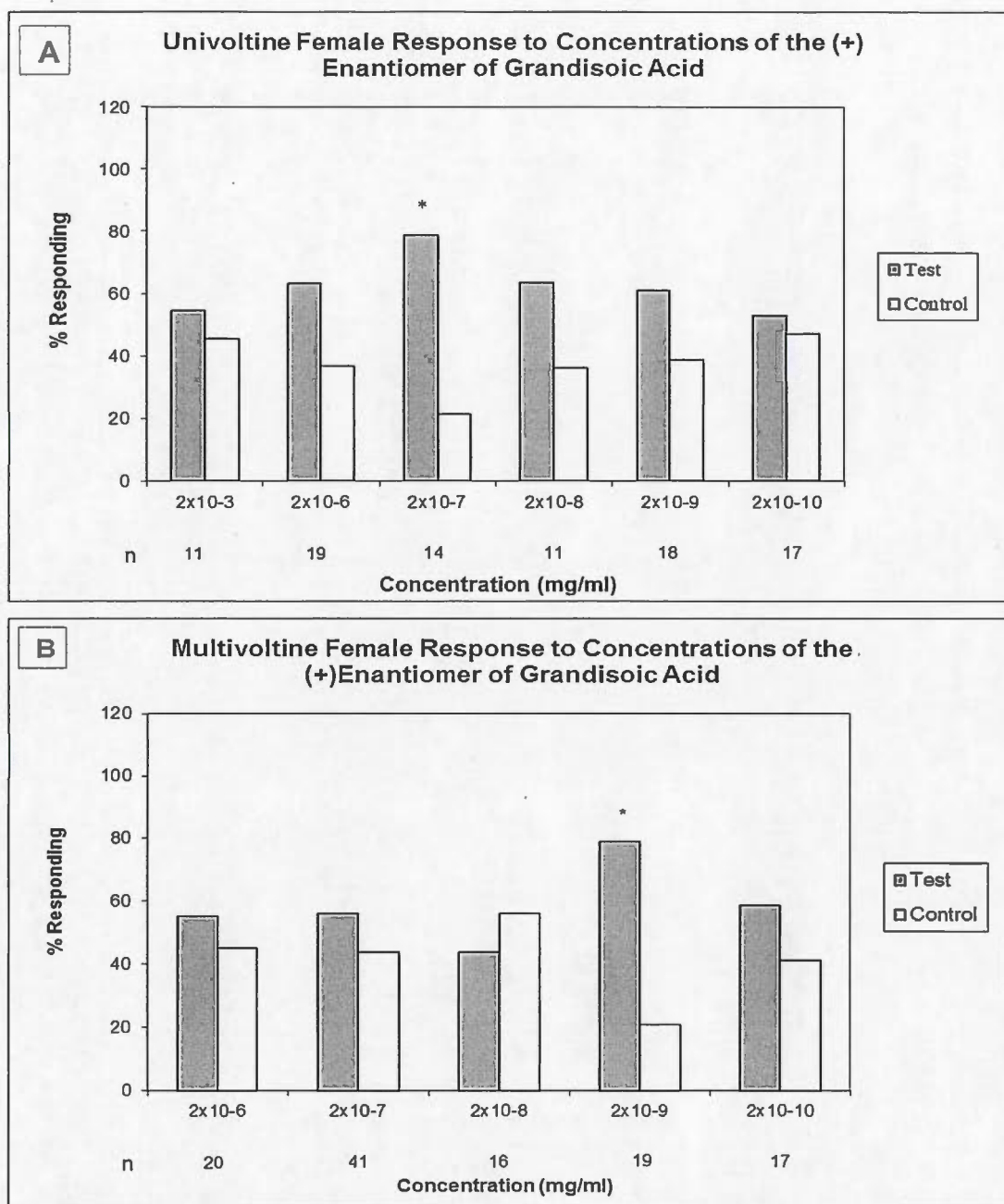


Figure 2.1 Percent of female PC responding to 1.5 mL of different concentrations of the (+) enantiomer of grandisoic acid ((+)GA) at the same enantiomeric purity (72% ee) vs. the control in a vertical still-air two-way olfactometer. * denotes a significant difference between test and control odours at $\alpha = 0.05$ according to the χ^2 Test. A. Univoltine females. B. Multivoltine females.

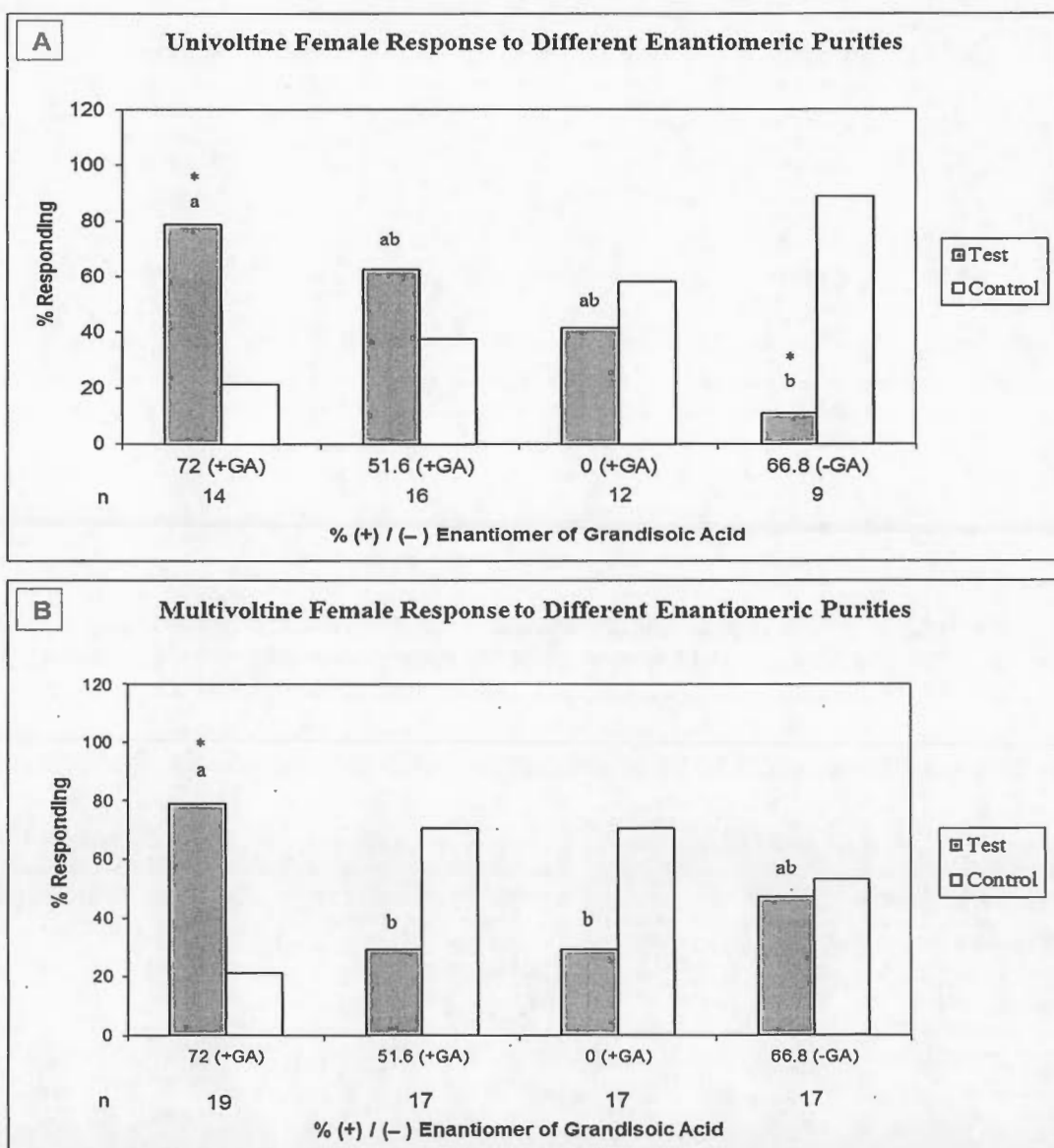


Figure 2.2 Percent of female PC responding to different enantiomeric purities of grandisoic acid enantiomers (+)GA and (-)GA vs. the control in a vertical still-air two-way olfactometer. * denotes a significant difference between test and control odours at $\alpha = 0.05$ according to the χ^2 test. Different letters denote significant differences between purities of enantiomers according to the χ^2 test with Bonferonni correction ($\alpha = 0.008$). A. Univoltine female response tested using 1.5 mL of at a concentration of 2×10^{-7} mg/mL. B. Multivoltine female response tested using 1.5 mL at a concentration of 2×10^{-9} mg/mL.

CHAPITRE III

OLFACTOMETER RESPONSES OF PLUM CURCULIO *CONOTRACHELUS* *NENUPHAR* (HERBST) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) TO HOST PLANT VOLATILES, SYNTHETIC GRANDISOIC ACID, AND LIVE CONSPECIFICS

3.1 Mise en contexte

Les résultats du chapitre II ont révélé que, pour les souches univoltine et multivoltine du CP, la plus grande pureté énantiomérique (72 %) de l'AG(+) provoquait la plus forte attraction chez la femelle mature et vierge. Les deux souches sont attirées par de faibles concentrations de cet énantiomère, mais la concentration à laquelle l'énantiomère (+) provoquait la plus forte attraction pour les femelles a différé chez les deux souches (2×10^{-7} mg/mL pour la souche univoltine et 2×10^{-9} mg/mL pour la souche multivoltine).

Les concentrations les plus attractives pour le CP ont été déterminées dans le chapitre II, mais des combinaisons de phéromone et de composés volatils de fruits de plantes hôtes peuvent être plus attirantes pour le CP que la phéromone seule. L'objectif du chapitre III était de déterminer quelles substances volatiles de plantes hôtes (naturelles ou synthétiques) étaient les plus attractives ou répulsives pour les charançons, et d'identifier les interactions éventuelles (*p.ex.* : les synergies) avec les composés olfactifs du mâle ou de la phéromone synthétique. Les femelles des souches univoltine et multivoltine du CP ont été exposées à différents composés olfactifs des plantes hôtes et à la phéromone dans un olfactomètre vertical à deux voies (sans pression d'air). Ce chapitre est une version légèrement modifiée, à la demande de l'Université, d'un article originalement soumis à la revue « Journal of Insect Behaviour ».

3.2A Résumé

Les odeurs émanant des plantes hôtes sont abondamment utilisées par les insectes pour la localisation de sources alimentaires et de partenaires sexuels. Certaines de ces odeurs agissent en synergie avec la phéromone d'agrégation de nombreuses espèces de Curculionidae, comme dans le cas du charançon de la prune *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae), un ravageur important des fruits à pépins et à noyau. Le mâle du charançon de la prune produit une phéromone agrégative – l'acide grandisoïque – qui attire les mâles et femelles de la souche univoltine du nord et de la souche multivoltine du sud. L'acide grandisoïque est une molécule chirale; la version synthétique de cette phéromone contient au départ des quantités égales d'énantiomère (+) et (-), mais la phéromone produite naturellement par les mâles contient seulement l'énantiomère (+). L'acide grandisoïque agit en synergie avec certaines odeurs des plantes hôtes et cette synergie entre les composés attractifs peut être utilisée pour augmenter les captures du charançon dans des pièges et pour améliorer les stratégies de dépistage de cet insecte. Cependant, cela nécessite une meilleure compréhension du comportement du charançon en ce qui concerne son attraction envers les odeurs de plantes hôtes, les effets synergiques avec la phéromone, et les conditions physiologiques pour lesquelles il existe une attraction. Des tests olfactométriques ont été effectués avec différentes odeurs de plante hôte dont le pouvoir attractif a été démontré dans des études publiées, afin de déterminer : 1) les odeurs les plus attractives pour le charançon de la prune, et également dans quelles conditions physiologiques (statut sexuel, âge, niveau de jeûne), 2) si l'énantiomère (+) de la phéromone d'agrégation synthétique et l'odeur du mâle vivant agissent en synergie avec des composés volatils de la plante hôte, 3) s'il y a une différence de réponse entre les deux souches par rapport aux composés volatils testés, et 4) s'il y a une différence de réponse pendant la scotophase. Des femelles des souches univoltine et multivoltine ont été

exposées à différentes odeurs des plantes hôtes (benzaldéhyde, trans-2-hexénal, essences ou esters de prune, de pommes ou de bleuets), à de l'acide grandisoïque, à l'odeur naturelle émise par des pommettes et à l'odeur naturelle émise par des mâles, dans un olfactomètre vertical à deux voies. La femelle mature a été davantage attirée par l'essence de prune que la femelle immature ou âgée. La femelle à jeun n'a toutefois pas été davantage attirée par l'essence de prune. Les odeurs synthétiques des plantes hôtes testées n'ont suscité ni d'attraction ni de répulsion, tandis que l'odeur naturelle des pommes a eu un effet attractif pour la femelle à jeun. L'essence de prune n'a pas provoqué d'effet synergique lorsqu'utilisée en combinaison avec l'odeur de deux mâles ou avec l'énantiomère (+) de l'acide grandisoïque synthétique et les réponses mesurées à ces combinaisons d'odeurs n'étaient pas différentes pour la femelle à jeun ou nourries avant les tests.

MOTS-CLÉS : phéromone d'agrégation, sémiochimique, attractif, répulsif, synergie, charançon.

3.2B Abstract

Host plant odours are important for insect location of food and mates. Synergy between host plant odours and aggregation pheromones occurs in many Curculionidae species and can be used to increase trap captures and improve monitoring techniques. The pest plum curculio *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) produces an aggregation pheromone, grandisoic acid, a chiral molecule. The synthetic racemic mixture contains a pair of optical isomers with equal amounts of (+)- and (-)-enantiomers; males only produce the (+) enantiomer. Improved understanding of the conditions under which host plant volatiles attract and synergize with the pheromone would greatly improve monitoring of this insect. Olfactory tests were performed in a

dual choice vertical olfactometer to determine 1) which odours are attractive (or repulsive) and under what physiological conditions (mating status, age, starvation period), 2) if the synthetic (+)-enantiomer or the odour of live males synergizes with host plant volatiles, 3) if there is a difference in response between the two plum curculio strains to host plant and pheromone volatiles, and 4) if there is a difference in response between different hours of scotophase. Females were exposed to host plant odours (benzaldehyde, trans-2-hexenal, thinning apples), various commercially available food extracts (of plums, apples, and blueberries), grandisoic acid, and live males. Mature females responded more to plum essence than immature or old females. Plum essence was the only attractive synthetic host plant odour. Starvation did not increase attraction to plum essence, but the natural odour of thinning apples was attractive only to starved females. Plum essence did not synergize with the odour of two males or the (+)-enantiomer of synthetic grandisoic acid, nor did starvation increase response to these odour combinations among females.

KEY WORDS: host plants, aggregation pheromone, semiochemicals, attractants, repellents, synergy, weevil.

3.3 Introduction

Olfactory cues are used by the plum curculio (PC) *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae), a major pest of pome and stone fruits (Vincent and Roy, 1992), to locate fruit for feeding and oviposition (Butkewich and Prokopy, 1993; Butkewich *et al.*, 1987). In addition to host plant volatiles PC produce an aggregation pheromone [(+)-(1R, 2S)-1-methyl-2-(1-methylethenyl) cyclobutaneacetic acid] (Eller and Bartelt, 1996). This pheromone (grandisoic acid) is emitted by males who only produce the (+) or dextrorotatory enantiomer (+)GA (Eller and Bartelt, 1996). However the synthetically produced racemic mixture of grandisoic is attractive in some studies (Piñero *et al.*, 2011), weakly attractive in other studies (Eller and Bartelt, 1996; Leskey *et al.*, 2005; Leskey *et al.*, 2008), and yet un-attractive in others (Leskey and Prokopy, 2000; Akotsen-Mensah, 2010; Hock *et al.*, 2015 – Chapter 2). Male-produced multi-component aggregation pheromones are produced by other similar weevil species as well (Tumlinson *et al.*, 1969; Eller *et al.*, 1994; Innocenzi *et al.*, 2001), indicating that this may also be the case for PC (Leskey *et al.*, 2009a, 2009b; Hock *et al.*, 2014 – Chapter I, 2015 – Chapter II, Annexe A).

Pheromones have been shown to synergize with host plant volatiles resulting in increased attraction for many weevil species (Landolt and Phillips, 1997; Poorjavad *et al.*, 2009; Tinzaara *et al.*, 2007) including PC (Piñero *et al.*, 2001; Akotsen-Mensah *et al.*, 2010), and have been used as trap baits in attempts to more accurately monitor this pest (Prokopy and Leskey, 1997; Piñero and Prokopy, 2003; Leskey *et al.*, 2005). However, competition from natural odour sources present within the orchard reduces trap captures (Leskey and Wright, 2004b), specifically after petal fall (Prokopy *et al.*, 2002; Leskey and Wright, 2004a). Piñero *et al.* (2011) have developed a trap-tree approach that can attract PC to specific trees baited with pheromones, however trap-trees require the sacrifice of several trees along the perimeter rows of orchards and also

cause damage to non-baited neighbour trees (Leskey *et al.*, 2008; Piñero *et al.*, 2011; Leskey *et al.*, 2014 – see Annexe B). The trap-tree approach can still be improved by identifying a more attractive odour source which would 1) efficiently maintain attraction, aggregation, and retention of adult PC within specific baited trap-tree canopies in apple orchards, and 2) limit PC damage to neighbouring trees (Leskey *et al.*, 2008; Piñero *et al.*, 2011; Leskey *et al.*, 2014 – see Annexe B). Alternatively, volatiles which repel PC can be used as part of a push-pull strategy where border row trees are baited with attractive and repellant volatiles to protect the interior of the orchard, similar to an antiaggregation pheromone (Ross and Datterman, 1995; Cook *et al.*, 2007; Leskey *et al.*, 2014 – see Annexe B). This results in PC being ‘pushed’ away from the neighbouring trees, and ‘pulled’ towards the baited trees, thereby limiting the amount of damage in unbaited-trees near the baited trees in the ‘trap-tree zone’ (Leskey *et al.*, 2014 – see Annexe B). This method could also be a useful component of attract and kill strategies, whereby the baited tree is further treated with pesticides, thereby also limiting pesticide applications to trap-trees instead of the entire orchard (Leskey *et al.*, 2008, 2014 – see Annexe B).

Age and mating status influence the response to olfactory cues in other beetles; for example, younger boll weevils produce more pheromone than older weevils (Spurgeon, 2003), and mated males are less attractive than virgin males in the rice weevil *Sitophilus oryzae* Linnaeus (Phillips and Burkholder, 1981). An understanding of similar conditions in PC can result in advancements of management techniques by indicating when PC would be most attracted to certain volatiles and thereby improving trap baits by using the most attractive pheromone blends for the targeted age of PC.

We used olfactory experiments to determine behavioural responses of both strains of PC to various synthetic and natural odors of pheromones and host-plants using PC under different conditions (*i.e.* different mating status, ages, and starvation periods).

The synthetic volatiles tested in experiments are naturally present in the principal host plants of PCs (Polavarapu *et al.*, 2004; Leskey and Wright, 2007; Lafleur *et al.*, 2007; Akotsen-Mensah, 2010). Volatiles from the preferred host (*i.e.* plum) are expected to be the most attractive, while volatiles such as trans-2-hexenal (T2H) may be attractive or repellent based on previous studies (Leskey *et al.*, 2001; Prokopy *et al.*, 2001). Attractive natural or synthetic host-plant volatiles were also examined for synergy with attractive natural or synthetic pheromone odours. Synthetic odours of plums and benzaldehyde are known to be attractive to PC in the field (Akotsen-Mensah, 2010; Piñero *et al.*, 2011), and are likely candidates for synergy with such pheromone components as those emitted by live males (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I) as well as synthetic (+)GA (Hock *et al.*, 2015 – Chapter II). We predicted that starved females would respond more strongly than fed females to odours as they may signal the presence of a suitable food source (Landolt and Phillips, 1997). Females should also respond more strongly to natural odours since they may contain more complete chemical formulas than what is produced synthetically (Leskey *et al.*, 2009b). Some small differences in responses between mated and virgin females as well as between strains were also expected due to previous observations (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I, 2015 – Chapter II). In addition, the responses of PC during different hours of scotophase were recorded since PC are more active during certain hours of the evening (Racette *et al.*, 1990, 1991; Chouinard *et al.*, 1993), and their activity patterns during scotophase can influence their behaviour and response towards semiochemicals.

Experiments were designed to determine 1) which of the plant volatiles tested are the most attractive or repulsive to curculios and under which conditions (mating status, age, starvation period), 2) if host plant volatiles increase attraction or synergize with the synthetic grandisoic acid or with live males and under what conditions, 3) if there is a difference in the responses between univoltine and multivoltine female curculios, and 4) if there are any differences in responses during the different hours of scotophase.

3.4 Materials and Methods

3.4.1 Plum curculio

We tested both strains of PC as per Hock *et al.* (2014 – Chapter I, 2015 – Chapter II). We collected apples (*Malus* sp.) infested with univoltine PC in late June and early July 2009 from unsprayed orchards in Saint-Bruno-de-Montarville, Québec, Canada (45.55028°N, 73.31917°W) and placed them in emergence cages (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I). We removed emerging adults daily and separated them by sex (Thompson, 1932), transferring them to overwintering cages (Le Blanc, 1992) where they were kept under natural conditions throughout winter and then removed the following spring. We then placed them in 2 L plastic containers with small apples and water in environmental control chambers at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% R.H., with 16L:8D to mimic optimal summer conditions (Amis and Snow, 1985).

We took multivoltine curculios from a laboratory population established at the Appalachian Fruit Research Station (Kearneysville, WV) in 2001 (Leskey *et al.*, 2010; Hock *et al.*, 2014 – Chapter I, 2015 – Chapter II). We reared adults in the laboratory at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, and a 14L:10D photoperiod on a diet of green thinning apples and water (Amis and Snow, 1985). Adults were allowed to mate and lay eggs in thinning apples, and subsequent emerging larvae were placed in 500 mL jars containing soil to undergo pupation. Jars were shipped to the Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA; St-Hyacinthe, Quebec, Canada) and then placed in environmental control chambers ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% R.H., 16L:8D) (Hock *et al.*, 2014 –

Chapter I, 2015 – Chapter II). Emerging adults were collected daily, separated by sex and held under the same conditions as the univoltine strain.

Fed female curculios of both strains were used as responders unless otherwise noted, and were always sexually mature except for one experiment, where different age groups of immature (two to eight days old), mature (17-22 days), and old (30-36 days) females of only the univoltine strain were tested in order to determine the effect of age on response to the host plant volatile PE. In addition, females were usually fed except in experiments where we wished to test if nutritional status had an effect on response. In such experiments females were starved (e.g. for either 24, 48, or 72 h) prior to experimentation. All females were also virgin except for experiments where mated females of only the univoltine strain were used to test for the effect of mated status on response to PE. In this case, females from the ‘mated’ modality were held with males for two weeks prior to experiments to allow for mating. All females from ‘mated vs. virgin’ experiments were dissected at the end of the experiment to assess their physiological status (mature/immature and mated/virgin). After the olfactometric tests, females were placed in 70% ethanol and held at 4°C (Hoffmann *et al.*, 2004; Hock *et al.*, 2014 – Chapter I). Their status was assessed using the criteria from Hoffmann *et al.* (2004), this involved examining oocytes and spermatheca. Although an attempt was made to test the same odours for both strains, occasionally limited numbers of PC were available, or we were unable to procure more volatiles with the exact same composition / enantiomeric purity, resulting in some experiments being conducted only on a single strain. Limited PC numbers during trials were due to sporadic outbreaks of fungi in rearing colonies and the difficulty in transporting PC during the winter (*i.e.* shipping multivoltine PC from WV long distances to Qc.) (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I).

3.4.2 Olfactometer

A vertically orientated still-air olfactometer identical to Hock *et al.* (2014 – Chapter I, 2015 – Chapter II) was used. This olfactometer takes advantage of the insect's natural tendency to crawl and climb up trees (Racette *et al.*, 1991; Chouinard *et al.*, 1992, 1993) and the fact that PC are most active in the absence of wind (Racette *et al.*, 1991; Chouinard *et al.*, 1992; Prokopy *et al.*, 1995), especially under humid and warm conditions during the evening (Lafleur and Hill, 1987; Racette *et al.*, 1992; Chouinard *et al.*, 1992). The olfactometer consisted of a large (inner Ø = 105 mm, 50 mm in height) round Pyrex® glass container (Corning Inc., Corning, New York, USA). Two lateral openings on the apex (inner Ø = 24 mm, 60 mm height) were connectors to the odour-containing jars, both of which were covered with standard nylon mosquito screening to prevent insects from joining odour sources. The central opening at the apex (inner Ø = 24 mm, 60 mm height) was the point of introduction for PC into the arena. Odour jars consisted of upside-down 500 mL standard glass Mason™ jars (Bernardin LTD., Richmond Hill, On., Canada); one jar containing the 'test' odour source and the other containing the control, air, a common control odour in olfactometric trials (Tinzaara *et al.*, 2007; Tafoya *et al.*, 2003; Addesso and McAuslane, 2009). Parafilm®M (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) was used to secure the Mason jar to the olfactometer. Experiments were conducted during a simulated scotophase (night), since PC are known to be more active at night (Smith and Flessel, 1968; Racette *et al.*, 1990, 1991; Chouinard *et al.*, 1993). Odour zones were randomized after each replicate to limit any bias associated with the environment of the olfactometer. The entire olfactometer was dismantled daily, prior to each new experiment, washed with Sparkleen™ soap (Fisherbrand, Pittsburgh, Penn., USA), rinsed with acetone and hexane (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) to remove any possible lingering odours or contamination (Ruiz-Montiel *et al.*, 2003; Altuzar *et al.*, 2007; Ambrogi and Zarbin, 2008; Prasuna *et al.*, 2008), and air-dried.

3.4.3 Experimental conditions

Tests were done as per Hock *et al.* (2014 – Chapter I, 2015 – Chapter II). The olfactometer was placed in an observation room (ca. $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and 70% R.H.) (Smith and Flessel, 1968; Racette *et al.*, 1991; Chouinard *et al.*, 1993). A red filter (LEE Filter, red primary no. 106®, Son-Art Production, Saint-Hyacinthe, Qc, Canada) that allows only wavelengths of 630-800 to pass covered a neon light (40W) that served as the sole source of light during experiments (Prokopy *et al.*, 1995). We used a still-air setup to avoid disturbing PC, similar to other olfactometer experiments (Prokopy *et al.*, 1995; Leskey *et al.*, 2001; Akotsen-Mensah, 2010; Hock *et al.*, 2014 – Chapter I, 2015 – Chapter II). Tests were started at the beginning of scotophase, and the time when insects were tested was always recorded. At the beginning of each trial one female (one replicate) was introduced into the olfactometer and left for 30 min, after which its position was noted and the female removed. Only insects found within a radius of 10 mm or within the tubes leading to the odour jars were used for statistical analysis. All other positions were considered as no choice having been made and were disregarded in analysis (average of approximately 35%) (Tinzaara *et al.*, 2007; Altuzar *et al.*, 2007; Akotsen-Mensah, 2010). The average number of replicates was 20, however occasionally replicate number was higher or lower because there were occasional deaths of PC age groups during rearing, and because not all PC responded during trials (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I, 2015 – Chapter II). This gave a range of 9 to 66 replicates between experiments, though replicates within the same trial were closer in numbers (for example, trials examining synergy between odours all had between 12 and 15 replicates).

3.4.4 Source material

Both synthetic and natural host plant odours were selected based on volatiles present in various PC host-plants (*i.e.* plums, apples, and blueberries) that are known to elicit behavioural responses (Eller and Bärtelt, 1996; Coombs, 2001; Piñero and Prokopy, 2003; Akotsen-Mensah, 2010). All synthetic odours were kept in a freezer at -21°C until use. We used 1.5 mL microcentrifuge tubes (Sigma-Aldrich Canada, Ltd.) with a cotton wick inserted through a hole at the top and to allow dispersal of the odours, which were then filled with the synthetic test odour. Tests using more than one synthetic odour source were done by placing a micro tube of each odour in the same olfactometer test jar. Synthetic host plant volatiles used in this study included plum essence (PE) (Milne Fruit Products Inc. 804 Bennett Avenue, Prosser, WA, USA) (the most attractive synthetic host plant volatile in pre-tests, plums also being the native and favorite host plant of PC (Quaintance and Jenne, 1912; Leskey and Wright, 2007)), T2H (Sigma-Aldrich Canada Ltd.), blueberry essence (BE) (Kerry Inc. Ingredients and Flavours, 555 Rutherford, Grandby, Qc., Canada), McIntosh apple essence (MAE) (Kerry Inc. Ingredients and Flavours, 555 Rutherford, Grandby, Qc., Canada), apple essence (AE) (Metarom Neotech Inc., 5000 Armand Frappier, St-Hubert, Qc., Canada), and benzaldehyde (BEN) (Sigma-Aldrich Ltd.). Natural fruit odours tested consisted of thinning (young) McIntosh apples – a favourite food source of PC (Quaintance and Jenne, 1912; Leskey and Wright, 2007) – collected from apple orchards during the summer of 2010 and kept in cold storage (5°C) until use in experiments. Previous studies (Leskey and Prokopy, 2001) found punctured fruit to be the most attractive to PC compared to un-punctured fruit, and that there was little difference in attraction in regards to how the punctures were made (*i.e.* mechanical vs. feeding punctures from live males), we therefore decided to test the response of fed females and females starved for 24 h to five un-punctured and five punctured thinning apples as well. Prior to the beginning of each experiment apples were washed to remove any pesticides

present. 'Punctured' apples consisted of apples with two holes (one old made 24 h prior, and one fresh made immediately before the start of the experiment) using a sterile pin in order to simulate PC feeding injuries (old and fresh, respectively) (Leskey and Prokopy, 2001).

Some host plant odours were tested for synergy based on the literature and also on the results of the trials with attractive individual odours done herein: BEN + PE, two males + five un-punctured apples, two males + plum essence, and (+)GA + plum essence. Field tests have shown that the combination of PE and BEN is also attractive to multivoltine females (Akotsen-Mensah *et al.*, 2010), which is why we chose to test this odour combination on multivoltine females in our olfactometric tests. Male PC used were virgin and mature, as this was previously found to attract females of both strains in olfactometric tests (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I). To measure female PC attraction towards host plant volatiles in conjunction with the odour naturally emitted by virgin males, we placed two males in 500 mL odour jars with either apples or microcentrifuge tubes of synthetic host plant volatiles. Solutions of synthetic (+)GA were also tested based on its previous observed attraction to females (Hock *et al.*, 2015 – Chapter II). Solutions were made by diluting the granular form in heptane (Sigma-Aldrich Ltd.). A concentration of 2×10^{-7} mg/mL of (+)GA with an optical purity of 72% was used for univoltine females, since this was the concentration and purity found to attract the most females in our previous laboratory studies using different concentrations and purities of (+)GA (Hock *et al.*, 2015 – Chapter II). The (+)GA was obtained from the University of Quebec at Chicoutimi (Qc., Canada) as per the methods described in Hock *et al.* (2014 – Chapter I). Briefly, grandisol was obtained commercially and directly converted to grandisoic acid using pyridinium dichromate in dimethylformamide. Resolution of grandisol was obtained in gas chromatography using β -cyclodextrin stationary phase to show that it was racemic. Using simple gradient condition at pH 4.5 in high performance liquid chromatography with a β -CD column, selectivity was

observed for grandisoic acid. Direct separation of grandisoic acid was optimized to selectivity $\alpha = 1.1$ and APCI-MS analysis was performed to confirm the identities of grandisoic acid enantiomers (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I, 2015 – Chapter II). Odours T2H and (+)GA + PE were only tested on univoltine females.

3.4.5 Statistical analysis

We used SPSS statistical software (SPSS Inc. 2006, Chicago, Illinois) for analysis of all data (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I, 2015 – Chapter II). Comparisons between choices (test vs. control) were analyzed using a χ^2 test ($P = 0.05$); a Yates continuity correction was applied when necessary (Siegel and Castellan, 1988). Since all insects were tested during scotophase, and it is possible that response differs during the different hours of scotophase (*e.g.* late vs. early evening), PC response during different hours of scotophase were analysed using a χ^2 test (Sokal and Rohlf, 1995). Any comparisons between two experiments or treatments were also done using a χ^2 test ($P = 0.05$).

3.5 Results

3.5.1 Female response to synthetic host plant odours

Significantly more univoltine females responded to PE compared to the control ($\chi^2=5.538$, $df=1$, $P=0.019$), and T2H was found to be significantly repulsive ($\chi^2=10.286$, $df=1$, $P=0.001$) (Table 3.1). No other synthetic host-plant volatile elicited

a significant response (MAE: $\chi^2=3.267$, $df=1$, $P=0.071$; BE: $\chi^2=2.000$, $df=1$, $P=0.157$; AE: $\chi^2=1.000$, $df=1$, $P=0.317$; or BEN: $\chi^2=0.333$, $df=1$, $P=0.564$) (Fig. 3.1).

For multivoltine females, PE and BEN were the only synthetic volatiles tested, with PE being significantly more attractive than the control ($\chi^2=4.000$, $df=1$, $P=0.046$) (Table 3.1), and BEN significantly repulsive compared to the control ($\chi^2=12.250$, $df=1$, $P=0.000$) (Fig. 3.1). We tested the odour combination of PE and BEN with multivoltine females which resulted in a significant repulsive response from multivoltine females ($\chi^2=8.333$, $df=1$, $P=0.004$) (Fig. 3.1).

3.5.2 Response of different ages of females to PE

The response of immature univoltine females to PE vs. the control was not statistically significant ($\chi^2=2.070$, $df=1$, $P=0.085$) (Fig. 3.2). Significantly more mature females were attracted to PE compared to the control ($\chi^2=5.121$, $df=1$, $P=0.024$). There was no significant difference in the response of old females to PE vs. control ($\chi^2=0.022$, $df=1$, $P=0.881$) (Table 3.1).

3.5.3 Fed vs. starved female response to PE alone or with (+)GA

Significantly more fed univoltine females responded to PE than the control jar ($\chi^2=4.455$, $df=1$, $P=0.035$). There was no difference in response to PE vs. control for starved females (Fig. 3.3) for any starvation period (24 h: $\chi^2=0.067$, $df=1$, $P=0.796$; 48 h: $\chi^2=0.617$, $df=1$, $P=0.250$; 72 h: $\chi^2=0.000$, $df=1$, $P=1.000$) and no significant difference between starvation periods (0 h - 72 h, $\chi^2=0.655$, $df=3$, $P=0.884$) (Table 3.1).

For multivoltine females the situation was similar, with only fed females giving a significant response to PE ($\chi^2=4.172$, $df=1$, $P=0.041$), while all starvation periods gave except for 72 h gave no significant response (24 h: $\chi^2=0.222$, $df=1$, $P=0.637$; 48 h: $\chi^2=1.333$, $df=1$, $P=0.248$; 72 h: $\chi^2=4.455$, $df=1$, $P=0.035$) (Table 3.1). There was a significant difference between starvation periods (0 h – 72 h, $\chi^2=13.732$, $df=3$, $P=0.003$), with fed females responding significantly more than those starved for 48 h ($\chi^2=10.667$, $df=1$, $P=0.001$).

Although there was no significant difference in response to PE for any of the starvation periods mentioned previously for univoltine females, numerically more univoltine (and significantly more multivoltine females) chose PE when starved for 72 h than any of the other starvation periods. This was therefore the starvation period chosen to gage the influence of starvation on PC response to the concentration of 2×10^{-7} mg/mL of (+)GA in the presence of PE for the univoltine strain. There was no significant difference between fed female response to control vs. (+)GA with PE ($\chi^2=0.333$, $df=1$, $P=0.564$) (Fig. 3.4) but there was a significant repulsion to the combination of (+)GA and PE from females starved for 72 h ($\chi^2=4.000$, $df=1$, $P=0.046$), though the difference between the two treatments (fed vs. starved) was not significant ($\chi^2=0.818$, $df=1$, $P=0.365$) (Table 3.1).

3.5.4 Response of fed and starved females to natural host plant odours

Significantly more univoltine females starved for 24 h responded to un-punctured ($\chi^2=9.308$, $df=1$, $P=0.002$) and punctured apples ($\chi^2=5.333$, $df=1$, $P=0.021$) than to the control (Fig. 3.3), though there was no significant difference in their response to

punctured vs. un-punctured apples ($\chi^2=0.005$, $df=1$, $P=0.944$), nor between starved vs. fed females to un-punctured apples ($\chi^2=0.182$, $df=1$, $P=0.669$). There was also no significant difference in the response of fed univoltine females to either un-punctured ($\chi^2=3.000$, $df=1$, $P=0.083$) or punctured apples ($\chi^2=0.000$, $df=1$, $P=1.000$) vs. the control (Fig. 3.4).

Neither starved (24 h) nor fed multivoltine females showed any significant difference in response to the apple modalities (*i.e.* fed females, un-punctured apples: $\chi^2=0.818$, $df=1$, $P=0.366$; fed females, punctured apples: $\chi^2=0.818$, $df=1$, $P=0.366$; starved females, un-punctured apples: $\chi^2=0.600$, $df=1$, $P=0.439$; starved females, punctured apples: $\chi^2=1.237$, $df=1$, $P=0.872$) (Table 3.1).

Since no difference in the response to punctured vs. un-punctured apples was observed, un-punctured apples were used to test the response of females to the odour combination of five apples with two mature virgin males. For univoltine females, neither those fed or starved for 24 h gave a significant response (fed: $\chi^2=1.667$, $df=1$, $P=0.197$; starved 24 hr: $\chi^2=1.333$, $df=1$, $P=0.248$) (Fig. 3.4).

The situation was similar for multivoltine PC. Two males with five apples failed to elicit a significant response from fed and starved females (fed: $\chi^2=0.250$, $df=1$, $P=0.617$; starved 24 h: $\chi^2=0.333$, $df=1$, $P=0.564$) (Table 3.1).

3.5.5 Mated and virgin female response to PE alone or with (+)GA

Significantly more univoltine virgin females were attracted to PE than the control ($\chi^2=5.000$, $df=1$, $P=0.025$) (Table 3.1). There was no significant difference in the

response to PE vs. control from mated females ($\chi^2=2.250$, $df=1$, $P=0.134$), nor any difference between the response of virgin vs. mated females ($\chi^2=0.615$, $df=1$, $P=0.433$). The addition of two males to PE did not further enhance the response of virgin females ($\chi^2=1.000$, $df=1$, $P=0.317$) (Fig. 3.4).

For virgin multivoltine females, the response to the odour combination of PE with two males was similarly non-significant ($\chi^2=0.800$, $df=1$, $P=0.371$) (Table 3.1). All females dissected from both strains were mature having developed oocytes, and females in the 'mated' modality had copulated possessing sperm in the spermatheca as evidenced by its opaque and cloudy appearance (Hoffmann *et al.*, 2004).

3.5.6 Female response during scotophase

No treatment was found to elicit a significant attraction (or repulsion) ($P = 0.05$) when compared to the test odour during scotophase. This was the case for all experiments and treatments tested.

3.6 Discussion

Of the synthetic volatiles tested, only PE elicited the strongest attraction from mature, fed, females of both strains, supporting the bioassay results of Akotsen-Mensah (2010). Leskey and Prokopy (2001) also found that bioassay responses of female PC to the odour of fresh wild plums (*Prunus americana* Marshall) were significantly stronger compared to the control. Volatiles from 'Stanley' plum elicit strong electroantennogram responses (EAG) from PC (Leskey *et al.*, 2009a; Hock *et al.*, 2014

– Chapter I); with some plum cultivars (European *P. domestica* L.: ‘Stanley’, ‘Japanese’ *P. salicina* Lindl.: ‘Formosa’, and ‘Santa Rosa’) being preferred over others such as American cultivars (*P. americana*) (Leskey *et al.*, 2001, 2005; Leskey and Wright, 2007). Plum essence was found to be highly attractive to PC in field trials (Coombs, 2001; Whalon *et al.*, 2006; Akotsen-Mensah *et al.*, 2010), indicating its possible use as a component in baited traps. Our laboratory trials with fed PC support the results these field trials, despite the fact that none of the starvation periods elicited any significant response similar to the laboratory results of Akotsen-Mensah (2010). Thus PE could be used throughout the season as a component of baited traps.

Mated univoltine females did not significantly respond to PE. Observations have been made on PC (Leskey *et al.*, 2001; Akotsen-Mensah, 2010) and on other beetles (Oceallachin and Pyan, 1977; Phillips and Burkholder, 1981; Rochat *et al.*, 1991) where mating status has not been shown to affect response. Conversely, there are cases where differences in attraction after mating have been observed in Curculionids (Shu *et al.*, 1998; Qi and Burkholder, 1982; Walgenbach *et al.*, 1983; Hock *et al.*, 2014 – see Chapter I), though no significant difference was found between mated and virgin females in this study. However, pure PE could be signifying severely damaged fruit which might mean that the fruit is unsuitable for oviposition, *i.e.* that other females have already deposited their eggs in that particular fruit, since an increase in the amount of larvae within a fruit can decrease larval survival (Butkewich *et al.* 1987). Studies have shown that female PC are able to discriminate against heavily damaged fruit for oviposition purposes (Butkewich *et al.*, 1987) perhaps due to the type or quantity of volatiles released from the damaged tissue, which may signify an acceptable food source for virgin females who are looking for males and feeding sites, but an unusable site for mated females looking to oviposit. Using plum essence to attract virgin females towards attract-and-kill traps would reduce the amount of females that could mate and

therefore also reduce damage due to oviposition as well as decrease the subsequent 'summer' generation of PC.

The phenology of host plants is synchronized with the physiology of PC (Leskey *et al.*, 1996, 2001, 2010) and their attraction to natural odours is greatest when volatiles are extracted during petal fall (Quaintance and Jenne, 1912; Whitcomb, 1933; Steiner and Worthley, 1941), the phenological stage when PC are sexually mature, ready to lay eggs and found in greatest numbers on host plants (Hoffmann *et al.*, 2004; Leskey *et al.*, 2010). Thus the changes in PC physiology around this time (from immature to mature states) affect their response to odours. The composition of odours themselves is also changing based on plant phenology, and these changes may also increase the preference of PC for host plant odours (Leskey *et al.*, 2010), such as those represented by plum essence. Effect of age on response to host plant volatiles is seen in the pepper weevil (Addesso and McAuslane, 2009) and the maize and granary weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Sitophilus granarius* L. respectively (Wakefield, 1998). It could be possible that the other synthetic host plant volatiles tested (BEN, T2H, MAE, AE, BE) did not "represent" the correct phenological stage that is most attractive to mature PC, even though similarly formulated synthetic odors (ex. PE, BEN, T2H) have elicited responses at similar concentrations in previous studies (Leskey and Prokopy, 2001; Leskey *et al.*, 2008; Akotsen-Mensah, 2010). Perhaps some synthetically formulated odours are not as attractive as their counterparts found in nature, since natural odours have been shown to out-compete synthetic volatiles in orchard settings (Leskey and Wright, 2004b; Leskey *et al.*, 2008). However, the concentrations of some synthetic odours used herein (BEN, T2H, BEN+PE) did elicit a significant repulsion, indicating that these volatiles could be used in a push-pull strategy as repellents instead of attractants (Leskey *et al.*, 2014 – see Annexe B).

For example, BEN is attractive to PC in apple orchards alone and in various odour combinations (Piñero and Prokopy, 2003; Leskey *et al.*, 2008; Akotsen-Mensah *et al.*, 2010), but in our laboratory experiments BEN elicited either no response or it caused repulsion, depending on the strain of PC. These results are in accordance with those of Akotsen-Mensah (2010), who found that pure BEN as well as BEN lures were also inhibitory to multivoltine PC in olfactometric experiments, both alone and in combination with grandisoic acid or PE. Furthermore, the combination of benzaldehyde and racemic grandisoic acid was also unattractive to multivoltine curculios in peach orchards (Leskey, 2006; Akotsen-Mensah, 2010). Differences in environmental conditions (*e.g.* release rate of volatiles) and physiological conditions of PC (*e.g.* lab-reared *vs.* wild insects, strain used, etc.) were cited by Akotsen-Mensah (2010) as possible causes for the observed differences between the results observed in the various studies. It is likely that these are also the reasons for the differences observed between previous studies and our results, since the concentration tested in our olfactometric experiments was similar to that of other laboratory and field experiments (Leskey *et al.*, 2008; Akotsen-Mensah, 2010). Given that BEN is currently used as an attractant in apple orchards at a release rate of 228 mg/day/tree in a trap-tree strategy to control PC (Leskey *et al.*, 2014 – see Annexe B), using pure BEN as repellent as well may not be the best strategy, at least not in apple orchards. Using a completely different odour (*e.g.* T2H) as a repellent might be more effective.

In our studies, T2H was repulsive to univoltine females. In other insects T2H has been found to be attractive (Landolt and Phillips, 1997) and green leaf volatiles can be used for host-plant recognition (Metcalf and Metcalf, 1992; Bernays and Chapman, 1994) as well as to enhance the effects of pheromones among certain insects (Dickens *et al.*, 1990). EAG studies indicate that PC are capable of detecting and responding to 0.05 mL of evaporated T2H (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I), a lower concentration than the 1.5 mL of T2H used here. In the field, a release rate of 40 mg/day/tree (Prokopy *et al.*,

2003) of T2H was found unattractive, and T2H can be repulsive at 1.0, 0.10, and 0.01 mg/mL concentrations in laboratory bioassays (Leskey *et al.*, 2001). Thus T2H may have a possible use as a repellent for PC, protecting trees as the 'push' component in a push-pull approach (Leskey *et al.*, 2014 – see Annexe B).

Punctured apples were supposed to simulate feeding scars left by PC (Leskey and Prokopy, 2001) and were equally as attractive to starved (24 h) univoltine females as un-punctured apples. This indicates the attraction of starved PC to natural whole-fruit odours, supporting the results of Leskey and Prokopy (2001). Using the complete volatile combinations present in whole fruit (Leskey *et al.*, 2009b, 2010) may improve baits *vs.* using a single plant volatile as is currently done (Piñero *et al.*, 2011). However, the combination of five apples and two males did not enhance the attraction of plum curculio, whether fed or starved, neither did the combination of two males and plum essence or two males and (+GA). Although it is possible that males have fed on apples during the testing of the five apples + two males odour combination, Leskey and Prokopy (2001) found that females did not respond differently to the odour combinations of plums + males *vs.* mechanically injured plums, though females preferred both of these odors over the control (air). This indicates that PC do not seem to readily differentiate between mechanical injuries to fruit and injuries caused by other PC. The lack of attraction of the fruit + male or pheromone combinations supports previous laboratory findings. For example, though attractive separately, males or synthetic racemic grandisoic acid combined with whole fruit odours (*i.e.* plums) or plum essence had a neutral effect in bioassays (Leskey and Prokopy 2001; Akotsen-Mensah 2010). In some field trials PC pheromones can synergize with host-plant volatiles such as BEN (Piñero *et al.*, 2001; Piñero and Prokopy, 2003; Leskey *et al.*, 2005) and PE (Akotsen-Mensah *et al.*, 2010), and many weevil pheromones have been observed to synergize with host plant volatiles (Landolt and Phillips, 1997). Males can advertise their presence, through synergistic or additive interactions between the

odours they produce and host plant volatiles, to females by indicating an available food source nearby for feeding and oviposition, increasing their chances of attracting and mating with females (Landolt and Phillips, 1997).

In our study, starved (72 h) univoltine female PC seem to be repulsed by the combination of (+)GA and PE indicating they have no interest in the odour of males and may avoid them. Starvation has also been shown to decrease responsiveness to pheromones in the southern green stink bug, *Nezara viridula* L. (Brennan et al. 1977). Female PC require food to oviposit (McGiffen and Meyer, 1986; Butkewich and Prokopy, 1993), but it is unclear if they feed before mating. If females must feed prior to mating, this may prompt them to seek food before seeking males. Numerous males in the immediate vicinity may hamper feeding efforts by females, since males readily and repeatedly mate within short periods of time (Johnson and Hays, 1969), especially in the presence of fruit odours (Leskey and Prokopy, 2001). Conversely, it is also possible that when together, the mixture of volatiles may simply be in the wrong ratio for PC, since the concentrations of odours attractive individually may not necessarily be the same as the concentrations (or ratios) found attractive when these same odours are present in a mixture. For example, field trials have shown that the three-component combination of benzaldehyde, plum essence, and racemic grandisoic acid was less attractive than the 'host plant only' combination of benzaldehyde and plum essence, which showed an additive effect (Akotsen-Mensah 2010). Concentration and ratio of individual odours placed in a combination has been shown to be a very important factor in PC (Leskey et al., 2001; Leskey and Prokopy, 2001) and other weevil response (Coffelt and Burkolder, 1972; Hardee et al., 1974; Hallett et al., 1999). This is true regardless of whether synthetic and natural host-plant odours (Leskey et al., 2001), natural male-produced odours (Leskey and Prokopy, 2001; Hock et al., 2014 – Chapter I), or synthetic pheromones (Leskey and Prokopy, 2001; Hock et al., 2015 – Chapter II) are used, similar to what is seen in other insects (Messina and Dickenson, 1993; Fletcher et al., 1968). It is unlikely that the concentrations of PE and (+)GA used were

too high and overwhelmed PC, given that similar concentrations were individually found to be attractive to PC, both herein and in previous studies (Leskey and Prokopy, 2001; Leskey *et al.*, 2008; Akotsen-Mensah, 2010; Hock *et al.*, 2015). Our results support those of Leskey and Prokopy (2001) and Akotsen-Mensah (2010), suggesting that PC are primarily attracted to fruit volatiles and only secondarily to the odour of conspecifics, indicating the importance of fruit odours as key components in trap baits.

Generally both plum curculio strains responded similarly to most host plant odours, especially regarding plum essence. This means that plum essence could be used in baits to monitor both univoltine and multivoltine plum curculio, which would be more cost-effective in regions where the two strains overlap (*e.g.* Virginia, USA), compared to having to employ two different trap baits based on strain. However, the use of baits may still depend on the type of fruit orchard being protected, since the combined lure of racemic grandisoic acid and benzaldehyde was found to be effective in apple orchards but not in peach orchards (Leskey and Wright 2004a; Leskey 2006; Akotsen-Mensah 2010).

Most PC activity at the beginning of the season takes place during late afternoon and early evening (Racette *et al.*, 1990, 1991; Chouinard *et al.*, 1992; Dixon *et al.*, 1999) peaking between 16:00 and 24:00 h (Chouinard *et al.*, 1993). There is no evidence suggesting a peak 'hour' for olfactive responses (or pheromone emission) for PC. Our results showing no difference in response between the different hours of scotophase indicate that when PC are responding to attractive volatiles, the exact hour of scotophase may not play an important role. Any observed difference in response or activity of PC during a specific time may therefore be due in part to their physiological state (*e.g.* nutritional status) (Ruiz-Montiel *et al.*, 2009) and / or to the concentration of an odour (*e.g.* aggregation pheromone) (Ambrogi *et al.* 2008) rather than due to a specific hour of scotophase, and any increase in activity of PC at a particular time is

likely to be due to a combination of physiological and environmental factors present at that moment (*i.e.* temperature, humidity, etc.).

Given the results, future olfactometric studies should focus on using mature females and natural odours or extracts thereof, and tests using synthetic grandisoic acid or live males should include the use of fed responders. These results identify the conditions when PC are most attracted to certain odours, and therefore give an indication of which odours may work best as baits or repulsive / antiaggregation odours during the season. This information could improve monitoring techniques by developing better trap baits, or by the use of repellent volatiles for tree protection (Gökçe *et al.*, 2014; Leskey *et al.*, 2014 – see Annexe B).

3.7 Acknowledgements

We would like to thank Starker Wright at the USDA as well as the technicians, interns, and staff at IRDA for their assistance for their assistance in the laboratory and field; as well as André Pichette for supplying the grandisoic acid. These studies were supported by a grant from Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire de Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (Québec, Qc.).

3.8 Bibliography

- ADDESSO, K.M., et H.J. MCAUSLANE (2009). Pepper Weevil attraction to volatiles from host and nonhost plants. *Environ. Entomol.* 38: 216-224.
- AKOTSEN-MENSAH, C (2010). *Ecology and management of plum curculio, Conotrachelus nenuphar (Coleoptera: Curculionidae) in Alabama Peaches*. Mémoire de Doctorat, Auburn University, Alabama, USA. 180 p.
- AKOTSEN-MENSAH, C., R. BOOZER et H.Y. FADAMIRO (2010). Field evaluation of traps and lures for monitoring plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in Alabama Peaches. *J. Econ. Entomol.* 103(3): 744-753.
- ALTUZAR, A., E.A. MALO, H. GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ et J.C. ROJAS (2007). Electrophysiological et behavioural responses of *Scyphophorus acupunctatus* (Col., Curculionidae) to *Agave tequilana* volatiles. *J. Appl. Entomol.* 131(2): 121-127.
- AMBROGI, B.G., et P.H.G. ZARBIN (2008). Aggregation pheromone in *Sternechus subsignatus* (Coleoptera: Curculionidae): Olfactory behaviour and temporal pattern of emission. *J. Appl. Entomol.* 132: 54-58.
- AMBROGI, B.G., M.G. FONSECA, M.D.A. CORACINI et P.H.G. ZARBIN (2009). Calling behaviour and male response towards sex pheromone of poplar moth *Condyloporrhiza vestigialis* (Lepidoptera: Crambidae). *J. Pest Sci.* 82: 55-60.
- AMIS, A., et J.J. SNOW (1985). « *Conotrachelus nenuphar* ». P. Singh et R. F. Moore, (éds.), *Handbook of Insect Rearing*, Vol. 1. New York, Elsevier Science Publishing, p. 227-236.
- BERNAYS, E.A., et R.F. CHAPMAN (1994). *Host-plant selection by phytophagous insects*. New York, Chapman and Hall Inc., 312p.
- BRENNAN, B. M., F. CHANG et W.C. MITCHELL (1977). Physiological effects on sex pheromone communication in the southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Environ. Entomol.* 6(1): 169-173.
- BUTKEWICH, S.L., et R.J. PROKOPY (1993). The effects of short-range host odour stimuli on host fruit finding and feeding behaviour of plum curculio adults (Coleoptera: Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* 19(4): 825-835.

- BUTKEWICH, S.L., R.J. PROKOPY et T.A. GREEN (1987). Discrimination of occupied host fruit by plum curculio females (Coleoptera: Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* 13(8): 1833-1841.
- CHOUINARD, G., V. CHARLES, S.B. HILL et P. BERNARD (1992). Cyclic behaviour of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae), within caged dwarf apple trees in spring. *J. Insect Behav.* 5(3): 385-394.
- CHOUINARD G., S.B. HILL et C. VINCENT (1993). Spring behavior of the plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) within caged dwarf apple trees. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 86: 333-340.
- COFFELT, J.A., et W.E. BURKHOLDER (1972). Reproductive biology of the cigarette beetle *Lasioderma serricorne*. 1. Quantitative laboratory bioassay of the female sex pheromone from females of different ages. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 65: 447-450.
- COOK, S.M, Z.R. KHAN et J.A. PICKETT (2007). The use of push-pull strategies in Integrated Pest Management. *Ann. Rev. Entomol.* 52: 375-400.
- COOMBS, A. (2001). *Trap designs and attractants for monitoring plum curculio, Conotrachelus nenuphar* (Herbst). Mémoire de maîtrise en biology, East Lansing, MI, Michigan State University, 214p.
- DICKENS, J.C., E.B. JANG, D.M. LIGHT et A.R. ALFORD (1990). Enhancement of insect pheromone responses by green leaf volatiles. *Naturwissenschaften.* 77(1): 1-49.
- DIXON, B.M., R.J. PROKOPY et B.B. SCHULTZ (1999). Influence of weather and time of day on plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) tree canopy entry behaviors and evaluation of traps for predicting fruit injury. *J. Entomol. Sci.* 34: 191-202.
- ELLER, F.J., et R.J. BARTELT (1996). Grandisoic acid a male produced aggregation pheromone from the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*. *J. Nat. Prod.* 59: 451-453.
- ELLER, F.J., R.J. BARTELT, B.S. SHASHA, D.J. SCHUSTER, D.G. RILEY, P.A. STANSLY, T.F. MUELLER, K.D. SHULER, B/ JOHNSON, J.H. DAVIS et C.A. SUTHERLAND (1994). Aggregation pheromone for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii cano* (Coleoptera: Curculionidae): Identification and field activity. *J. Chem. Ecol.* 20: 1537-1555.

- FLETCHER, L.W., H.V. CLABORN, J.P. TURNER et E. LOPEZ (1968). Difference in response of two strains of screw-worm flies to the male pheromone. *J. Econ. Entomol.* 61(5): 1386-1388.
- GÖKÇE, A., L.L. STELINSKI, D.R. NORTMAN, W.W. BRYAN, et M.E. WHALON. (2014) Behavioral and Electroantennogram Responses of Plum Curculio, *Conotrachelus nenuphar*, to Selected Noxious Plant Extracts and Insecticides. *J. Insect Sci.* 14: 90. doi: 10.1093/jis/14.1.90
- HALLETT, R.H., A.C. OEHLISCHLAGER et J.B. BORDEN (1999). Pheromone trapping protocols for the Asian palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Inter. J. Pest Manag.* 45: 231-237.
- HARDEE, D.D., G.H. MCKIBBEN, D.R. RUMMEL, P.M. HUDDLESTON et J.R. COPPEDGE (1974). Response of boll weevils to component ratios and doses of the pheromone, grandlure. *Environ. Entomol.* 3: 135-138.
- HOCK, V., G. CHOUINARD, É. LUCAS et D. CORMIER, T. LESKEY, S. WRIGHT, A. ZHANG et A. PICHETTE (2014). Establishing abiotic and biotic factors necessary for reliable male pheromone production and attraction to pheromones by female plum curculios *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Can. Entomol.* 146: 528-547.
- HOCK, V., G. CHOUINARD, É. LUCAS, D. CORMIER, T.C. LESKEY, S.E. WRIGHT, A. ZHANG et A. PICHETTE (2015). Behavioral responses of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) to different enantiomer concentrations and blends of the synthetic aggregation pheromone grandisoic acid. *Environ. Entomol.* pp. 549-558. DOI: 10.1093/jee/tov026
- HOFFMANN, E.J., A.B. COOMBS et M.E. WHALON (2004). Reproductive development of northern and southern strains of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 97(1): 27-32.
- INNOCENZI, P.J., D.R. HALL et J.V. CROSS (2001). Components of male aggregation pheromone of strawberry blossom weevil, *Anthonomus rubi* Herbst. (Coleoptera: Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* 27(6): 1203-1218.
- JOHNSON, A.W., et S.B. HAYS (1969). Laboratory mating behaviour of the plum Curculio. *J. Econ. Entomol.* 62(2): 438-440.

- LAFLEUR, G., et S.B. HILL (1987). Spring migration, within-orchard dispersal, and apple-tree preference of the plum curculio in Southern Quebec. *J. Econ. Entomol.* 80: 1173-1187.
- LAFLEUR, G., G. CHOUINARD, C. VINCENT et D. CORMIER (2007). Impact of trap architecture, adjacent habitats, abiotic factors, and host plant phenology on captures of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) adults. *J. Econ. Entomol.* 100(3): 37-744.
- LANDOLT, P.J., et T.W. PHILLIPS (1997). Host plant influences on sex pheromone behaviour of phytophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 371-391.
- LE BLANC, J.P.R. (1992). *Trapping and monitoring techniques for plum curculio, Conotrachelus nenuphar (Herbst), (Coleoptera: Curculionidae) in a southwestern Quebec apple orchard*. Mémoire de Doctorat, McGill University, Quebec, Canada.
- LESKEY, T.C., et R.J. PROKOPY (2000). Sources of apple odour attractive to adult plum curculios. *J. Chem. Ecol.* 26(3): 639-653.
- LESKEY, T.C., et R.J. PROKOPY (2001). Adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) attraction to fruit and conspecific odours. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 275-288.
- LESKEY, T.C., et S. WRIGHT (2004a). Monitoring plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae), population in apple and peach orchards in the Mid-Atlantic. *J. Econ. Entomol.* 97(1): 79-88.
- LESKEY, T.C., et S. WRIGHT (2004b). Influence of host tree proximity on adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) responses to monitoring traps. *Environ. Entomol.* 33(2): 389-396.
- LESKEY, T.C., et S. WRIGHT (2007). Host preference of the plum curculio. *Entomol. Exp. Appl.* 123: 217-227.
- LESKEY, T.C., C. BRAMLAGE, L. PHELAN et R.J. PROKOPY (1996). Attraction of plum curculio adults to host-plant and pheromonal extracts. *Fruit Notes*. 61(1): 7-9.
- LESKEY, T.C., R.J. PROKOPY, S. WRIGHT, P.L. PHELAN et L.W. HAYNES (2001). Evaluation of individual components of plum odour as potential attractants for adult plum curculios. *J. Chem. Ecol.* 27(1): 1-17.

- LESKEY, T.C., A. ZHANG et M. HERZOG (2005). Nonfruiting host tree volatile blends: novel attractants for the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 34(4): 785-793.
- LESKEY, T.C., J.C. PIÑERO, S. WOOD et R.J. PROKOPY (2008). Odour baited trap trees: a potential management tool for the plum curculio. *J. Econ. Entomol.* 101: 1302-1309.
- LESKEY, T.C., G. CHOUINARD et C. VINCENT (2009a). « Monitoring and management of the apple maggot fly and the plum curculio: honoring the legacy of R.J. Prokopy ». M. Aluja, T.C. Leskey et C. Vincent (éds.), *Biorational Tree Fruit Pest Management*. UK, Wallingford, Oxon, CABI Publishing; 2009. p. 110-144.
- LESKEY, T.C., S. WRIGHT, W. ANGER, G. CHOUINARD, D. CORMIER, A. PICHETTE et A. ZHANG (2009b). Electroantennogram technique for *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 38(3): 870-878.
- LESKEY, T.C., T.J. HANCOCK et S. WRIGHT (2010). Host Tree-Related Differences in trap captures and electroantennogram activity for the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae). *Can. Entomol.* 142: 284-293.
- LESKEY, T.C., S.E. WRIGHT, V. HOCK, G. CHOUINARD, D. CORMIER, K. LEAHY, D. COOLEY, A. TUTTLE, A. EATON et A. ZHANG (2014). Evaluating electrophysiological and behavioral responses to volatiles for improvement of odor-baited trap-tree management of *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 43(3):753-761.
- MCGIFFEN, M.E. Jr., et J.R. MEYER. (1986). Effect of environmental factors on overwintering phenomena et spring migration of the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 15(4): 884-888.
- MESSINA, F.J., et J.A. DICKINSON (1993). Egg-Laying behaviour in divergent strains of the cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae): Time budgets and transition matrices. *Annals Entomol. Soc. Amer.* 86(2): 207-214.
- METCALF, R.L., et E.R. METCALF (1992). Fruit flies of the family *tephritidae*. R.L. Metcalf et E.R. Metcalf (éds), *Plant kairomones in insect ecology and control*, New York, Routledge, Chapman & Hall, 168 p.
- O'CEALLACHAIN, D.P., et M.F. RYAN (1977). Production and perception of pheromones by the beetle *Tribolium confusum*. *J. Insect Phys.* 23:1303-1309.

- PADULA, A.L., et E.H. SMITH (1971). Reproductive incompatibility between univoltine males and multivoltine females of the plum curculio. *Ann. Soc. Entomol. Am.* 64: 665-668.
- PHILLIPS, J.K., et W.E. BURKHOLDER (1981). Evidence for a male-produced aggregation pheromone in the rice weevil. *J. Econ. Entomol.* 74: 539-542.
- PIÑERO, J., et R.J. PROKOPY (2003). Field evaluation of plant odour and pheromonal combinations for attracting plum curculios. *J. Chem. Ecol.* 29: 2735-2748.
- PIÑERO, J.C., S. WRIGHT et R.J. PROKOPY (2001). Response of plum Curculio (Coleoptera: Curculionidae) to odor-baited traps near woods. *J. Econ. Entomol.* 94(6): 1386-1397.
- PIÑERO, J.C., A.M. AGNELLO, A. TUTTLE, T.C. LESKEY, H. FAUBERT, G. KOEHLER, L. LOS, G. MORIN, K. LEAHY, D.R. COOLEY et R.J. PROKOPY (2011). Effectiveness of odor-baited trap trees for plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) monitoring in commercial apple orchards in the Northeast. *J. Econom. Entomol.* 104: 1613-1621.
- POLAVARAPU, S., V. KYRYCZENKO-ROTH et J.D. BARRY (2004). Phenology and infestation patterns of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) on four highbush blueberry cultivars. *J. Econ. Entomol.* 87: 1899-1905.
- POORJAVAD, N., S.H. GOLDANSAZ et A. AVAND-FAGHIH (2009). Response of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* to its aggregation pheromone under laboratory conditions. *Bull. Insectol.* 62(2): 257-260.
- PRASUNA, A.L., K.N. JYOTHI, A.R. PRASAD, J.S. YADAV et B. PADMANABAN (2008). Olfactory responses of banana pseudostem weevil, *Odioporus longicollis* Olivier (Coleoptera: Curculionidae) to semiochemicals from conspecifics and host plant. *Curr. Sci.*, 94(10): 896-900.
- PROKOPY, R.J., et T.C. LESKEY (1997). Do natural sources of odour enhance plum curculio attraction to traps? *Fruit Notes.* 62(1): 9-12.

- PROKOPY, R.J., J. SYLVIA, S. COOLEY et P.L. PHELAN (1995). Bioassay approaches to assessing behavioural responses of plum curculio adults (Coleoptera: Curculionidae) to host fruit odour. *J. Chem. Ecol.* 21(8): 1073-1084.
- PROKOPY, R.J., P.I. PHELAN, S.E. WRIGHT, A.J. MINALGA, R. BARGER, T.C. et LESKEY (2001). Compounds from host fruit odor attractive to adult plum curculios (Coleoptera : Curculionidae). *J. Entomol. Sci.* 36(2): 122-134.
- PROKOPY, R.J., B.W. CHANDLER et J.C. PIÑERO (2002). Commercial orchard evaluation of traps for monitoring plum curculio: 2001 results. *Fruit Notes.* 67: 17-22.
- PROKOPY, R.J., B.W. CHANDLER, S.A. DYNOK et J. PIÑERO (2003). Odor-baited trees: a new approach to monitoring plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 96: 826-834.
- QI, Y., et W.E. BURKHOLDER (1982). Sex pheromone biology and behaviour of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *J. Chem. Ecol.* 8(2): 527-534.
- QUAINTANCE, A.L., et E.L. JENNE (1912). *The plum curculio*. USDA, U.S. Department of Agriculture, Bureau of Entomology Bulletin, 103. 252 p.
- RACETTE, G., S.B. HILL et C. VINCENT (1990). Actographs for recording daily activity of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 83(6): 2385-2392.
- RACETTE, G., G. CHOUINARD, S.B. HILL et C. VINCENT (1991). Activity of adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) on apple trees in spring. *J. Econ. Entomol.* 84: 1827-1832.
- RACETTE, G., G. CHOUINARD, C. VINCENT et S.B. HILL (1992). Ecology and management of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae), in apple orchards. *Phyto.* 73: 85-100.
- ROCHAT, D., C. MALOSSE, M. LETTERE, P.H. DUCROT, P. ZAGATTI, M. RENOU et C. DESCOINA (1991). Male-produced aggregation pheromone of the American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): collection, identification, electrophysiological activity, and laboratory bioassay. *J. Chem. Ecol.* 17: 2127-2141.

- ROSS, D.W., et G.E. DATERMAN (1995). Efficacy of an antiaggregation pheromone for reducing Douglas-fir beetle, *Dendroctonus pseudotsugae* Hopkins (Coleoptera: Scolytidae), infestation in high risk stands. *Can. Entomol.* 127(6): 805-811.
- RUIZ-MONTIEL, C., H. GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. LEYVA, C. LLANDERAL-CAZARES, L. CRUZ-LÓPEZ et J.C. ROJAS (2003). Evidence for a male-produced aggregation pheromone in *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 96(4): 1126-1131.
- RUIZ-MONTIEL, C., J.C. ROJAS, L. CRUZ-LÓPEZ et H. GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ (2009). Factors Affecting Pheromone Release by *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 38(5): 1423-1428.
- SHU, S., Y.I. PARK, S.B. RAMASWAMY et A. SRINIVASAN (1998). Temporal profiles of juvenile hormone titers and egg production in virgin and mated females of *Heliothis virescens* (Noctuidae). *J. Ins. Physiol.* 44:1111-1117.
- SIEGEL, S., et N.J. CASTELLAN (1988). *Nonparametric statistics for the behavioural sciences*. 2nd Edition, New York: McGraw-Hill, 399 p.
- SMITH, E.H., et J.K. FLESSEL (1968). Hibernation of the plum curculio and its spring migration to host trees. *J. Econ. Entomol.* 61(1): 193-203.
- SOKAL, R.R., et F.J. ROHLF (1995). *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. 3rd edition. New York, W.H. Freeman, 776 p.
- SPURGEON, D.W (2003). Age dependence of pheromone production by the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 32(1): 31-38.
- STEINER, H.M., et H.N. WORTHLEY (1941). The plum curculio problem on peach in Pennsylvania. *J. Econ. Entomol.* 34(2): 249-255.
- TAFOYA, F., J. LOPEZ-COLLADO, D. STANLEY, J. ROJAS et J. CIBRIÁN-TOVAR (2003). Evidence of an aggregation pheromone in males of the cactus weevil *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 32(3): 484-487.
- THOMPSON, J.R (1932). Sex differentiation of adults of *Conotrachelus nenuphar*. *J. Econ. Entomol.* 25: 807-810.

- TINZAARA, W., C.S. GOLD, M. DICKE, A.V. HUIS et P.E. RAGAMA (2007). Host plant odours enhance the responses of adult banana weevil to the synthetic aggregation pheromone cosmoluret ®. *Internat. J. Pest Manage.* 53(2): 127-137.
- TUMLINSON, J. H., D.D. HARDEE, R.C. GUELDNER, A.C. THOMPSON, P.A. HEDIN et J. P. MINYARD (1969). Sex pheromones produced by male boll weevils: isolation, identification, and synthesis. *Sci.* 166: 1010-1012.
- VINCENT, C., et M. ROY (1992). Entomological limits to biological control programs in Québec apple orchards. *Acta. Phytopathol. Entomol. Hung.* 27: 649-657.
- WAKEFIELD, M.E. (1998). *The effect of insect age on the response of three species of Sitophilus to 48, 5R-sitophilure and food volatiles*. Proceedings of the 7th International Working Conference on Stored-Product Protection vol. 2, China, Chengdu Beijing, Sichuan Publishing House of Science and Technology, p. 1513-1518.
- WALGENBACH, C.A., J.K. PHILHPS, D. FAUSTMI et W.E. BURKHOLDE (1983). Male-produced aggregation pheromone of the maize weevil, *Sitophilus zeamulus*, and interspecific attraction between three *Sitophilus* species. *J. Chem. Ecol.* 9: 831-841.
- WHALON, M., D. NORTMAN, J. WISE, L. GUT et D. EPSTEIN (2006). Plum curculio management and spray timing. *Michigan State Univ. Fruit CAT Newsletter.* 21: 1-3.
- WHITCOMB, W.D. (1933). Relation of temperature to the development of the plum curculio in apples. *J. Econ. Entomol.* 26: 415-419.
- ZHANG, X., et D.G. PFEIFFER (2008). Evaluation of reproductive compatibility of interstrain matings among plum curculio populations in the eastern United States. *Envir. Entomol.* 37(5): 1208-1213.

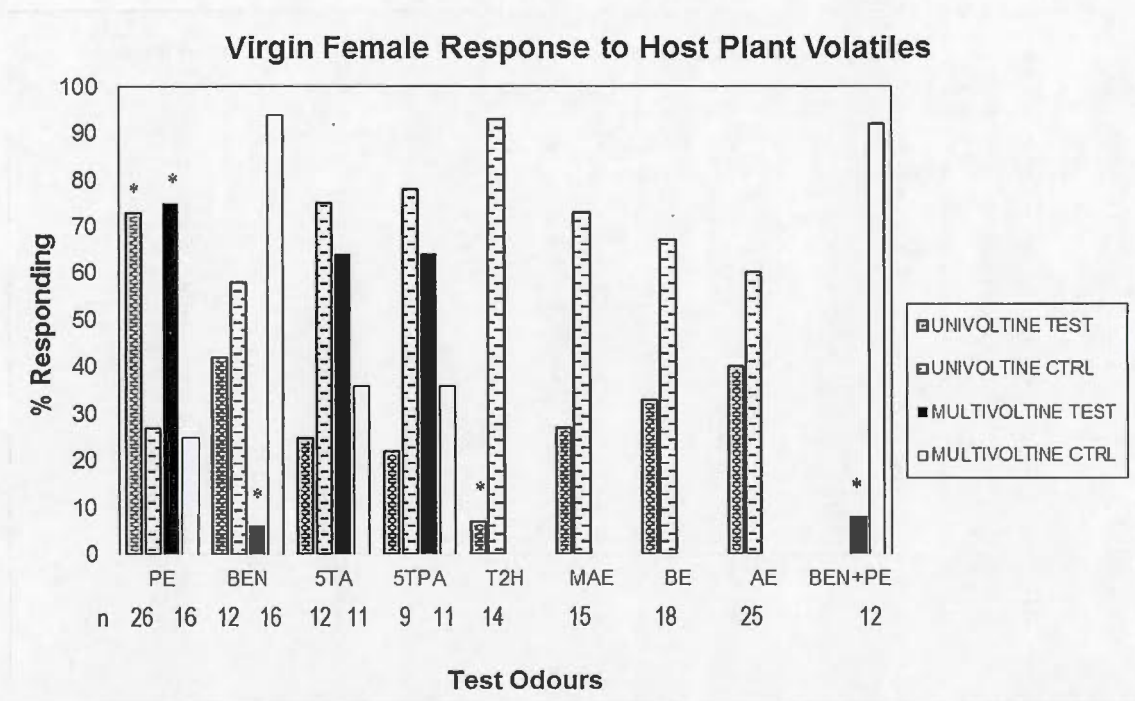


Figure 3.1 Percent of mature fed virgin univoltine female responding to different host plant volatiles (Test) vs. the control (Ctrl) in a dual choice olfactometer. Synthetic host-plant volatiles (1.5 mL): PE = plum essence, T2H = trans-2-hexenal, MAE = McIntosh apple essence, BE = blueberry essence, AE = apple essence, BEN = benzaldehyde. Non-synthetic host plant volatiles: 5TA = five thinning apples, 5TPA = five thinning punctured apples. * denotes a significant difference between test and control odours (χ^2 , $P = 0.05$). n= total number (test and control combined) of PC responding to different host plant volatiles. Due to a shortage of plum curculio at the time of testing, we were unable to test BEN+PE on univoltine females, and MAE, BE, and AE on multivoltine females.

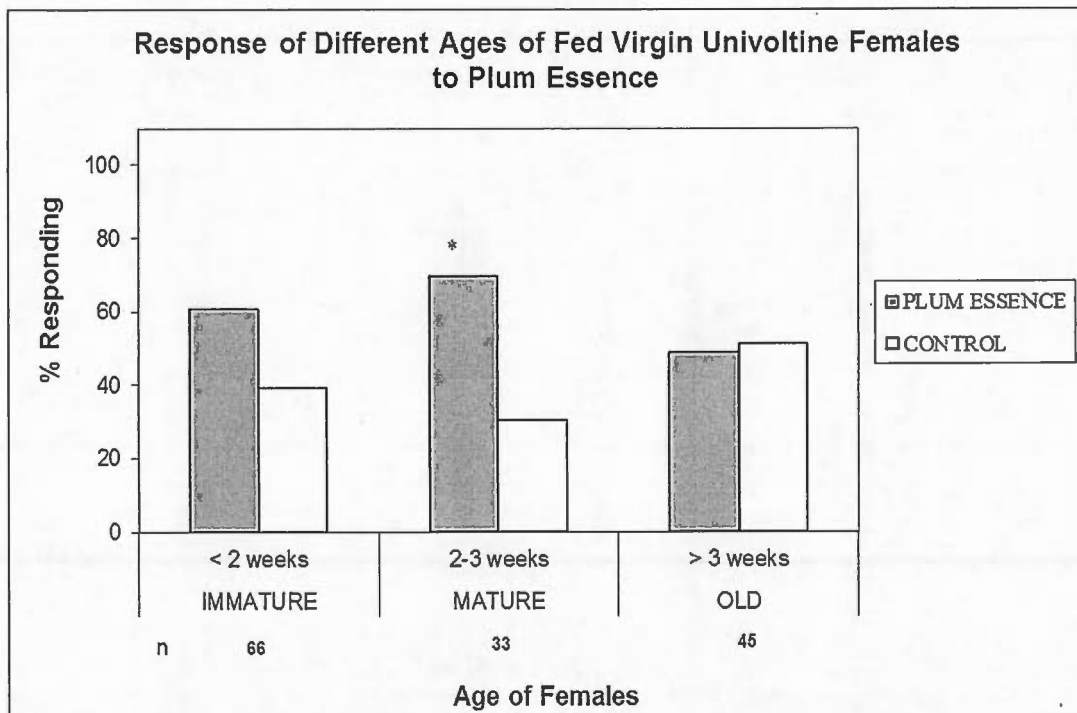


Figure 3.2 Percent of fed virgin univoltine females of different age groups (immature, mature, old) responding to plum essence (Test) vs. the control in a dual choice olfactometer. * denotes a significant difference between test and control odours (χ^2 , $P = 0.05$). n= total number (test and control combined) of PC responding to plum essence.

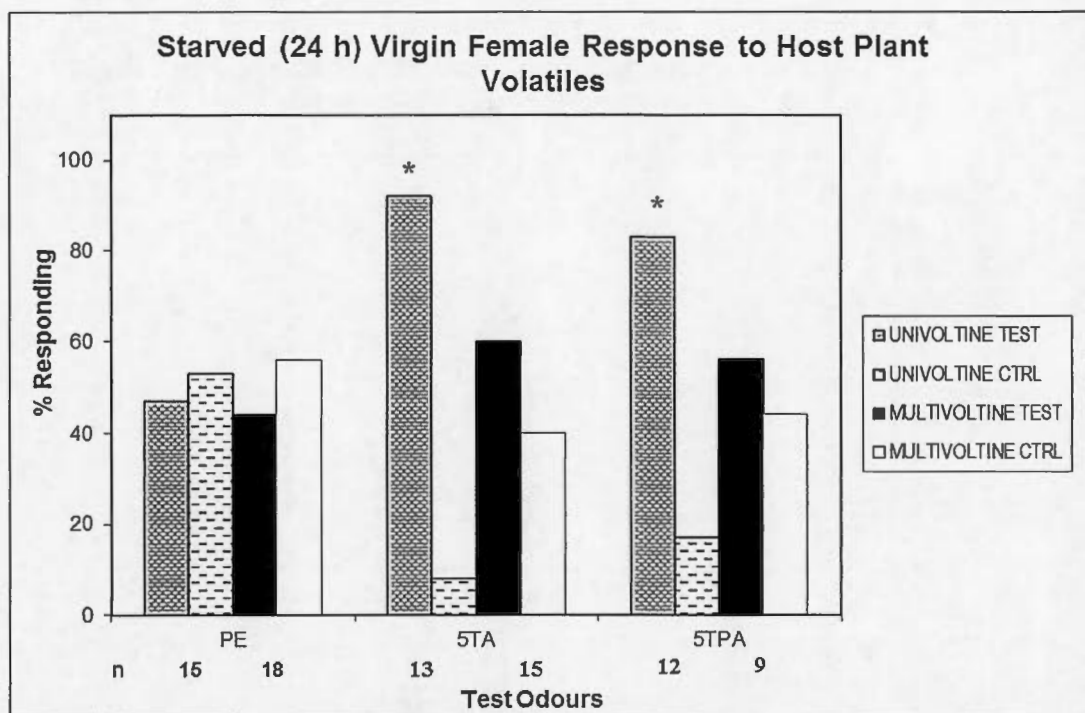


Figure 3.3 Percent of univoltine and multivoltine virgin females starved for 24 h responding to host plant volatiles (Test) vs. the control (Ctrl) in a dual choice olfactometer. 5TA = five thinning apples, 5TPA = five thinning punctured apples, PE = plum essence. * denotes a significant difference between test and control odours (χ^2 , $P = 0.05$). n= total number (test and control combined) of PC responding to different host plant volatiles.

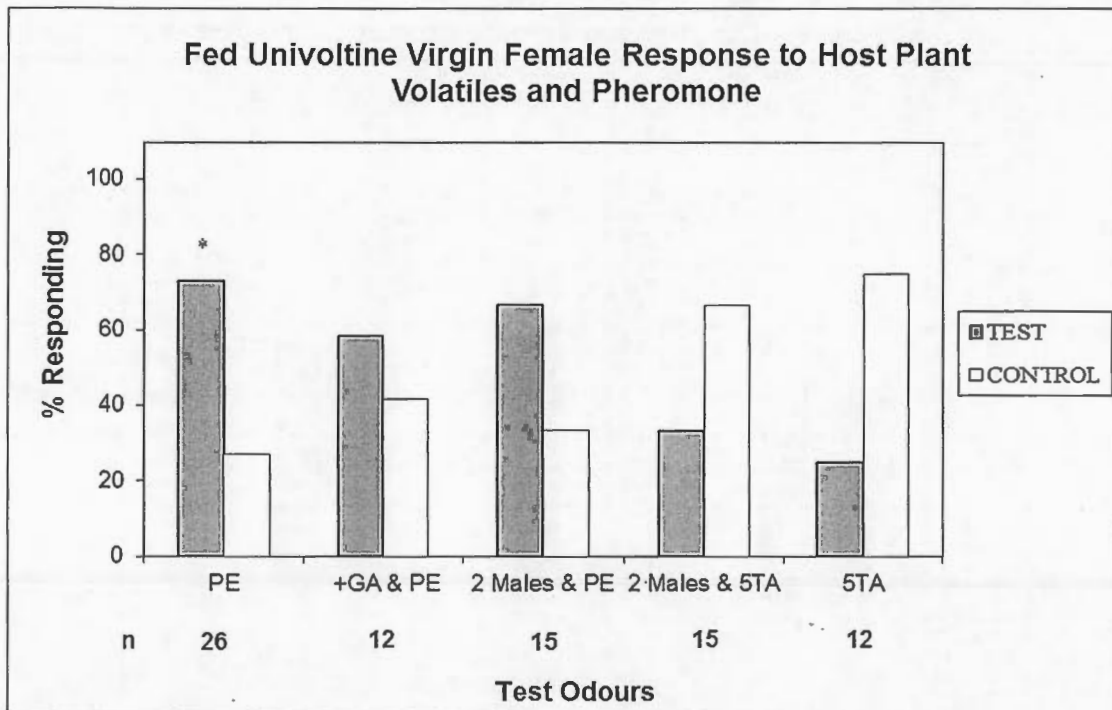


Figure 3.4 Percent fed virgin univoltine females responding to natural and synthetic host plant volatiles (Test) with/without natural and synthetic pheromone vs. the control in a dual choice olfactometer. PE = plum essence, 5TA = 5 thinning apples * denotes a significant difference between test and control odours (χ^2 , $P = 0.05$). n= total number (test and control combined) of PC responding to different volatiles.

Table 3.1 Response of plum curculio to pheromone and host plant volatiles

Olfactometric Tests		Statistic Results ($df = 1$)			
Physiological state of females	Odour	Univoltine PC		Multivoltine PC	
		χ^2	P	χ^2	P
Virgin, fed, immature / old	plum essence	2.070	0.085	Not applicable	Not applicable
		0.022	0.881	Not applicable	Not applicable
Virgin, fed, mature	plum essence	5.538	0.019*	4.000	0.046*
Mated, fed, mature	plum essence	2.250	0.134	Not applicable	Not applicable
Virgin, mature, and starved: (0 h), 24 h, 48 h, 72 h	plum essence	(4.455)	(0.035)*	(4.172)	(0.041)*
		0.067	0.796	0.222	0.637
		0.617	0.250	1.333	0.248
		0.000	1.000	4.455	0.035*
Virgin, fed, mature	McIntosh apple essence, blueberry essence, apple ester	3.267	0.071	Not applicable	Not applicable
		2.000	0.157		
		1.000	0.317		
Virgin, fed, mature	trans-2-hexenal	10.286	0.001**	Not applicable	Not applicable
Virgin, fed, mature	benzaldehyde	0.333	0.564	12.250	0.000**
Virgin, fed, mature	benzaldehyde and plum essence	Not applicable	Not applicable	8.333	0.004**
Virgin, fed, mature	5 thinning apples, 5 thinning punctured apples	3.000	0.083	0.818	0.366
		0.000	1.000	0.818	0.366
Virgin, mature, and starved 24 h	5 thinning apples, 5 thinning punctured apples	9.308	0.002*	0.600	0.439
		5.333	0.021*	1.237	0.872
Virgin, fed, mature	2×10^{-7} mg/mL 72% ee GA(+) and plum essence	0.333	0.564	Not applicable	Not applicable
Virgin, mature, and starved 72 h	2×10^{-7} mg/mL 72% ee GA(+) and plum essence	4.000	0.046*	Not applicable	Not applicable
Virgin, fed, mature	2 males and plum essence	1.000	0.317	0.8000	0.371
Virgin, fed, mature	2 males and 5 thinning apples	1.667	0.197	0.250	0.617
Virgin, mature, and starved 24 h	2 males and 5 thinning apples	1.333	0.248	0.333	0.564

Response of plum curculio to natural and synthetic host plant volatiles and pheromones. GA(+) = (+) enantiomer of grandisoic acid, ee = enantiomeric excess, df = degrees of freedom. * signifies significant differences (Chi Square test, χ^2) between test and control odours ($P = 0.05$); ** indicates that the odour was significantly repulsive.

CHAPITRE IV

MITES AFFECT PLUM CURCULIO (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) BEHAVIOURAL RESPONSES TO ATTRACTIVE VOLATILES

4.1 Mise en contexte

Les résultats du troisième chapitre ont révélé que la femelle mature et nourrie répondait davantage à l'essence de prune qu'aux autres composés olfactifs synthétiques, alors que la femelle à jeun ne démontrait pas une telle attraction. Les composés synthétiques testés (ex. trans-2-hexénal, benzaldéhyde, essence de pommes, essence de bleuets, etc.), bien que présents chez les plantes hôtes, n'ont pas suscité d'attraction, tandis que l'odeur naturelle des pommes a montré un pouvoir d'attraction sur les femelles à jeun. Cependant, certaines odeurs synthétiques ont suscité une répulsion des femelles. L'essence artificielle de prune utilisée en mélange n'a pas montré d'effet synergique, ni avec l'odeur des deux mâles, ni avec l'énantiomère (+) de la version synthétique de la phéromone agrégative (l'AG). Les réponses à ces combinaisons de composés olfactifs n'ont pas été plus fortes chez les femelles maintenues à jeun que chez celles nourries avant les essais.

Alors que le type de composé volatils ainsi que la physiologie de l'insecte peuvent affecter la réponse comportementale, d'autres paramètres sont susceptibles d'influencer le comportement de l'insecte. Des paramètres biotiques favorables dans des conditions optimales pour l'insecte peuvent s'avérer néfastes selon le changement de conditions.

Le chapitre IV avait pour but de déterminer si une infestation d'acariens pouvaient

altérer la réponse comportementale de l'insecte aux composés olfactifs attractifs. Puisqu'un CP se déplace au sol, il risque d'entrer en contact avec des acariens phorétiques susceptibles d'influencer son comportement. Ce chapitre portait sur une infestation d'acariens phorétiques du genre *Histiostoma* (Acari: Histiostomatidae) qui s'est produite durant l'élevage de la souche univoltine du CP. Des tests ont été effectués à l'aide d'un olfactomètre vertical à deux voies (sans pression d'air) et des CP infestés et non-infestés ont été soumis à des essais olfactométriques pour mesurer l'effet potentiel de la présence des acariens sur la réponse du CP à des composés volatils naturels et synthétiques. Ce chapitre est une version légèrement modifiée, à la demande de l'Université, d'un article originellement publié dans la revue « The Canadian Entomologist » volume 145, issue 01, pp. 82-87, 2013.

4.2A Résumé

Une infestation d'acariens phorétiques du genre *Histiostoma* sp. Kramer (Acari: Histiostomatidae) s'est produite dans l'élevage de la souche univoltine du charançon de la prune *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) établie en 2010 dans le sud du Québec au Canada. Des tests ont été effectués à l'aide d'un olfactomètre vertical à deux voies sans pression d'air afin de déterminer l'effet des acariens sur le comportement du CP. Les charançons infestés et non-infestés ont été testés et les résultats ont révélé un effet des acariens sur la réponse olfactométrique. Pour les odeurs synthétiques et naturelles attractives aux charançons, il y a significativement moins de charançons infestés par des acariens qui ont répondu aux odeurs que les charançons non-infestés. C'est pour cette raison que l'attraction des charançons infestés par des acariens vers les sources des odeurs était difficile à établir (faibles nombres de répondeurs). Cependant, tous les charançons infestés ayant répondu ont réagi positivement aux volatils testés de façon similaire aux insectes non-infestés. Cela nous indique que les acariens affectent la capacité des charançons à répondre aux volatils attractifs sans toutefois affecter leurs préférences.

MOTS-CLÉS : Acari, Histiostomatidae, acariens phorétiques, commensalisme, parasitisme, olfactomètre, charançon.

4.2B Abstract

An infestation of *Histiostoma* Kramer sp. mites (Acari: Histiostomatidae) occurred in rearing colonies of the univoltine strain of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae), established in 2010 in southern Québec, Canada.

Tests conducted in a two-choice still-air vertical olfactometer with mite-infested and non-infested plum curculio revealed that the number of beetles responding by walking towards normally attractive synthetic and natural odours was significantly lower for those infested with mites. Those mite-infested curculios that did discriminate between test odours and odour-free air all responded positively to the test volatiles, similar to the behaviour of non-infested insects. This indicates that mites affect plum curculio ability to physically move towards attractive volatiles but not odour preference.

KEY WORDS: Acari, Histiostatidae, phoretic mites, commensalism, parasitism, olfactometer, weevil.

4.3 Introduction

When analyzing plum curculio (PC) *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) dispersal, the impact of temperature (Whitcomb 1929), humidity (Chouinard *et al.*, 1993, 1994; Mulder *et al.*, 1997), wind (Racette *et al.*, 1990), rain (Bobb, 1949, 1952; Smith and Flessel, 1968), barometric pressure (Dixon *et al.*, 1999), photoperiod and season (Racette *et al.*, 1990, 1992; Chouinard *et al.*, 1992a, 1992b; Dixon *et al.*, 1999) have been well documented. PC dispersal and behaviour can also be altered by entomopathogenic fungi and bacteria (Garman and Zappe, 1929; Reissig *et al.*, 1984; Pereault, 2008), which is similar to what is seen in other insects (Vinson and Iwantsch, 1980; Beckage, 2005; Roy *et al.*, 2006). One factor not explored to date is the effect of other arthropods, such as phoretic mites, on the host-seeking behaviour and dispersal of PC.

Phoresy is the temporary attachment of an organism to another animal's exterior for the purposes of dispersal. It is a very common occurrence in mites, increasing their ability to migrate to new food sources and environments (Scheucher, 1957; Holte *et al.*, 2001). A common mite stage used for dispersal is the deutonymph (the last pre-adult stage), which will attach to the exterior of its host when it comes into contact with it (Capinera, 2008). Since mites lack wings, they need other ways to disperse to new areas, and in the field mites may use PC to disperse to other locations. The life cycle of phoretic mites is often tied to their hosts, with the new generation in the deutonymph stage dispersing similarly on the new generation of adult beetles (Capinera, 2008; Al-Deeb *et al.*, 2011, 2012). Although most phoretic mites appear to be host specific, they may opportunistically use a different host if their primary one is unavailable, at least until the primary host becomes available again, and the same mite species may be found to be mutualistic, commensalistic, or parasitic with its host beetle species, depending on the actual host species and conditions present (Capinera, 2008). Some mites may be

able to distinguish between mature and immature beetle hosts, preferring the mature adults for dispersal (Schwarz and Müller, 1992).

Phoretic mites are commonly found in damp habitats (Clark, 2010) and use arthropods for dispersal to new habitats (Scheucher, 1957; Holte *et al.*, 2001). For example, deutonymphs, especially of histiostomatid species (Acari: Astigmata), will usually disperse by using arthropods with similar habitat distributions (Al-Deeb *et al.*, 2011, 2012; Capinera, 2008). After diapause and pupation, PC typically emerge and disperse on the soil before emigrating to trees (Lafleur and Hill, 1987). Adults also periodically return to the soil when they drop from trees due to disturbances that cause them to exhibit thanatose behavior (Garman and Zappe, 1929; Racette *et al.*, 1991; Dixon *et al.*, 1999). On the soil, they may encounter phoretic deutonymphs (*i.e.* *Histiostomatidae* sp.) (Wirth, 2004). Previous studies have also confirmed that mites are able to use host-emitted semiochemicals to find suitable hosts (Schwarz and Koulianos, 1998; Niogret *et al.*, 2006; Amin *et al.*, 2009).

In small numbers, phoretic mites may have no detrimental effect (Holte *et al.*, 2001), however at higher concentrations they may inhibit host displacement and even metamorphosis (Amis and Snow, 1985; Elzinga and Broce, 1988; Smith, 1988), turning their relationship from commensalism to parasitism (Elzinga and Broce, 1988). For example, the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae), a beetle that has an adult size of about 35 mm, was found to carry between 42–1345 mites per beetle (Dilipkumar *et al.*, 2015). The mites included species from *Centrouropoda almerodai* Hiramatsu and Hirschman (Uropodidae), *Macrocheles mammifer* Berlese, *Macrocheles* cf. *oigru* Walter and Krantz (Macrochelidae), *Uroobovella assamomarginata* Hiramatsu and Hirschman, and *Uroobovella javae* Wiśniewski (Dinychidae). Phoretic species of mites can become parasitic when they are present on hosts in large numbers by reducing foraging ability,

movement, and can result in death by increasing exhaustion and vulnerability to predators (Bajerlein and Bloszyk, 2004; Al-Deeb *et al.*, 2011). Phoretic mites may also become parasitic when they prey on host larvae (Mazza *et al.*, 2011). In some species, even the presence of small quantities of mites can have a detrimental effect (Rocha *et al.*, 2009).

Mites have been known to infest PC larvae and adults (Smith, 1957; Broersma and Hays, 1966; Amis and Snow, 1985), and impair metamorphosis of this species as well as movement of other species of insects (Amis and Snow, 1985; Smith, 1988). This can effect PC host-finding ability and therefore also trap captures, as well as PC survival.

In order to ascertain the effect of phoretic mites on PC behaviour and displacement towards attractive odours, we conducted olfactometric bioassays to determine if mite-infested PC adults behave differently than non-infested PC regarding their response to volatiles. We wanted to determine 1) if phoretic mites influence PC odour preference *i.e.* preference for an attractive odour, and 2) if phoretic mites influence the mobility of PC, *e.g.* their ability to disperse towards an odour.

4.4 Materials and Methods

4.4.1 Identification of mites

We identified mites as phoretic deutonymphs of *Histiostoma* sp. (Acari: Histiostomatidae). Mites were identified by the Diagnostic Laboratory of the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (Direction de la Phytoprotection, Québec, Québec, Canada).

4.4.2 Plum curculio

We collected apples containing PC larvae from the field in 2009 in Saint-Bruno-de-Montarville, Québec, Canada (45.55028°N, 73.31917°W) during June drop and placed them in emergence cages. We collected emerging non-sexually mature adults daily and immediately separated them by sex (Thompson, 1932) and placed them in overwintering cages (Le Blanc, 1992) outdoors throughout the winter. Overwintered adults were collected the following spring as soon as the soil thawed but while temperatures were still cool. This ensured that all emerging adults were of a similar age (since they emerged from pupation and adults were placed in overwintering cages at similar times). Several adults from each container were sampled to verify sex and sexual immaturity. Adults were then placed in 2 L containers with small apples (McIntosh cultivar, 2–3 cm in Ø) and water and kept at 27 °C, 70% relative humidity, 16L:8D (light:dark hours). A laboratory colony was established using some of these wild individuals as per Hoffmann *et al.* (2007). Both wild and laboratory-reared insects were used in experiments. In order to bring laboratory-reared PC to maturity we treated them with pyriproxyfen as described in Hoffmann *et al.* (2007). Previous observations over several generations (Hoffmann *et al.*, 2007) reported no issues regarding PC treated with pyriproxyfen, nor were there any observed differences in behaviour or life cycle between wild and laboratory-reared strains noted in our laboratory. In addition, an experiment conducted in our laboratory with pyriproxyfen-treated and untreated (wild) females regarding response to the odour of two mature males showed no difference in response between PC.

All PC used in experiments were sexually mature and all PC tested were female. While the number of days elapsed since insect hatching may have differed between field-

collected and laboratory reared insects, insect age relative to sexual maturity was essentially the same. This is because wild individuals are still immature upon emergence from diapause requiring an average 13 days (Smith, 1957; Smith and Salkeld, 1964) to mature and lay eggs at 27 °C. Laboratory univoltine PCs emerging from diapause require treatment with pyriproxyfen to mature, and are able to lay eggs approximately 10 days after treatment (Hoffmann *et al.*, 2007).

In our environmental chambers wild and laboratory-reared individuals were found with mites and were quickly segregated to avoid infection of other wild and laboratory-reared PC colonies (uninfested PC). The source of infestation was most likely the apples used for maintaining wild and laboratory groups, as fruit flies were seen frequenting the apples and have previously been shown to carry phoretic mites with them (Amis and Snow, 1985). In containers with infestations, all PC in the container were examined and found to have at least one or more mites present. Random samples of PC revealed an average mite infestation of ≈ 10 –20 mites per PC. In laboratory-reared PC allowed to mate, the resulting offspring kept in the same environmental chambers and reared to adulthood were also found to be infested with mites. Infested PC used in our experiments carried about 10–20 mites each.

4.4.3 Source material

Plum essence (PE) (Milne Fruit Products Inc., Prosser, Washington, United States of America) and the odour of two live males were previously shown to attract female PC in our laboratory (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I; Chapter III) and were used as test odours. Plum essence is a synthetic mixture of plant essence; it is essentially a blend of concentrated plum juice that attracts plum curculio (Coombs, 2001; Whalon *et al.*, 2006). Males have been previously shown to produce an aggregation pheromone

termed grandisoic acid (Eller and Bartelt, 1996), and two males have been shown to attract the greatest number of females in our laboratory (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I). Either a 1.5 mL microcentrifuge tube (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville Ontario, Canada) of PE containing a cotton wick for odour dispersal (Experiment 1 and 3), or two virgin males (Experiment 2 and 4), were put inside a 500 mL Mason jar (Bernardin Ltd., Richmond Hill, Ontario, Canada) and secured to the olfactometer with Parafilm®M (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada).

4.4.4 Olfactometer.

We used an olfactometer (Fig. 4.1) consisting of a large (105 mm inner Ø, 50 mm in height) Pyrex® glass container (Corning Inc., Corning, New York, United States of America) with three main openings (24 mm inner Ø, 60 mm height) at the top. The openings served as a point of introduction for insects (central opening) into the arena and as connectors (left and right) to the odour jars which were placed on top and secured to the olfactometer with Parafilm®. Each jar contained either the test odour or the control odour (air only). Standard mosquito mesh covered the openings to prevent females from escaping or entering the jars. A Pyrex® glass Petri dish (150 mm Ø, 20 mm height) served as the base.

4.4.5 Experimental conditions

We conducted tests at 25 °C, 70% relative humidity during scotophase (Racette *et al.*, 1991; Chouinard *et al.*, 1993). We used a filter (LEE Filter, red primary no. 106®, Son-Art Production, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada) that allows only wavelengths of

630-800 to pass covered the lights during experiments because PCs are not perturbed by red light (Prokopy *et al.*, 1995). We placed a single female PC in the olfactometer for 30 minutes and its final position recorded. Plum curculio inside or within 1 cm of tubes leading to test or control jars were considered “responders” (*i.e.* PC having made an odour choice, either test or control); females in all other locations were considered “non-responders” (no choice having been made). In addition to comparing PC odour choice (test versus control) among responders, the proportion of non-responders was also compared to responders to gauge the effects of mites on PC ability to respond to odours. Odour zones were randomised after each replicate and the olfactometer was dismantled daily prior to each new experimental treatment, washed with Sparkleen™ (Fisherbrand, Pittsburgh, Pennsylvania, United States of America), and rinsed with acetone and hexane (Sigma-Aldrich Canada Ltd.). The average number of replicates was 18 (range 24-40 for responders *vs.* non-responders, and 3-20 for test *vs.* control) with replicates for the test *vs.* control mite-infested PC (responders only) being low because of the influence the mites had on PC movement. While an effort was made to keep the number of replicates similar between experiments, occasionally the replicate number was higher or lower because there were deaths of PC during rearing, and because not all PC responded during trials (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I, 2015 – Chapter II, Chapter III).

4.4.6 Statistical analysis

SPSS statistical software (SPSS Inc. 2006, Chicago, Illinois, United States of America) was used for analysis. Comparisons between the number of “responder” PC choosing test versus control as well as the number of responding and non-responding PC were done using a two-tailed χ^2 test and a Yates continuity correction was applied when necessary (Siegel and Castellan, 1988). χ^2 statistics ($P = 0.05$) were used to test

responders versus non-responders and test versus control individually for non-infested and infested PC. This was to demonstrate the characteristics of a normal PC response to each odour (non-infested) in order to allow comparison against the response of infested PC (*i.e.* if mites have no effect on PC, then the behaviour of infested PC should mimic that of non-infested PC regarding their response to each individual odour). Responses between experiments (PC with mites versus PC without mites for each of the two test odours) were also compared using a two-tailed χ^2 test ($P = 0.05$).

4.5 Results

There was no significant difference for uninfested PC between proportion of responders versus non-responders to odours in Experiment 1A (PE/control) ($\chi^2 = 1.000$, $df = 1$, $P = 1.000$) but there was a significantly higher proportion of responders than non-responders to odours in Experiment 2A (two males/control) ($\chi^2 = 5.556$, $df = 1$, $P = 0.018$) (Table 4.1). Beetles responded significantly more to both PE ($\chi^2 = 5.000$, $df = 1$, $P = 0.025$) in Experiment 3A, and two males ($\chi^2 = 10.286$, $df = 1$, $P = 0.001$) versus the control in Experiment 4A.

For infested PC there were significantly more non-responders than responders for both Experiment 1B (PE/control) ($\chi^2 = 9.000$, $df = 1$, $P = 0.003$) and Experiment 2B (two males/control) ($\chi^2 = 13.500$, $df = 1$, $P < 0.0001$) odours. All infested females chose PE (Experiment 3B) or two males versus the control (Experiment 4B).

Regarding uninfested PC vs. infested PC, non-infested females responded significantly more than infested females in both experiments (Experiment 1A/B (PE/control): $\chi^2 = 5.85$, $df = 1$, $P < 0.0156$ (Table 4.1); Experiment 2A/B (two males/control): $\chi^2 = 18.192$,

$df = 1$, $P < 0.0001$) (Table 4.1). There was no significant difference in odour choice between responding PC with or without mites regarding choice of test odours (Experiment 3A/B, PE: $\chi^2 = 0.391$, $df = 1$, $P = 0.532$; Experiment 4A/B, two males: $\chi^2 = 0.765$, $df = 1$, $P = 0.382$) (Table 4.1).

4.6 Discussion

To our knowledge this is the first report of *Histiostoma* sp. present on PC, and the first report of mites affecting the behaviour of PC towards an odor source; currently there are no studies comparing the responses of infested vs. uninfested PC. The mites have been observed on the same apples that are used by PC for feeding and oviposition purposes (personal observations), and may come into contact with PC larvae, pupae, and adults when infested apples drop to the ground. The drop of these apples allows PC larvae to exit and burrow into the soil and pupate, with new adults emerging two to three weeks later (Amis et Snow, 1985), and this may serve as a point of contact between mites and PC, especially adult PC, thus aiding in mite dispersal. Histiostomatidae are associated with decomposition of organic material, with the deutonymph stage specialising in using arthropods for transport and dispersal (Scheucher, 1957). Even small quantities of mites may affect insect dispersal (Rocha *et al.*, 2009), and a population explosion of mites would probably overload any PC they encounter, thus reducing the ability of PC to disperse and therefore their own dispersal as well.

The mites herein decreased PC ability to physically respond to odours, not their actual odour preference. Both PE and male PC odours were attractive to uninfested females, supporting previous results (Hock *et al.*, 2014 – Chapter I; Chapter III), and all infested

PC able to respond also chose the test odours (Table 4.1). Thus mites affect the ability of PC to actively respond and move towards odours but not PC odour preference itself. We noted that infested PC had problems climbing surfaces; the observed presence of mites on tarsi likely impaired PC movement. Amis and Snow (1985) also noted severe mite infestations hindered PC metamorphosis. In addition, mites can also inhibit insect flight and host seeking behaviour (Elzinga and Broce, 1988; Smith, 1988). For example, a quantity of more than seven phoretic mites reduced the flight take-off ability of the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) (Rocha *et al.*, 2009), a weevil slightly smaller (*i.e.* 3 mm adult size) than PC. Extremely large phoretic loads (>1000 mites per individual) have also been found on the red palm weevil (Dilipkumar *et al.*, 2015). In the Arabian rhinoceros beetle *Oryctes agamemnon arabicus* (F.) (Coleoptera: Scarabaeidae), 32-45 deutonymphs of *Sancassania sp.* (Acari: Astigmata: Acaridae) (hypopial stage) were found on average per beetle, with as many as 3057 mites on a single female (Al-Deeb *et al.*, 2012). Given these examples, it is highly likely that PC can encounter enough mites (*i.e.* ≥ 10) that would inhibit PC movement under natural conditions. In our colonies heavy infestations (30+ mites) completely immobilised PC.

Damage to host health is counterproductive regarding mite dispersal but large quantities of mites may cause unavoidable damage, which may occur when there is a lack of hosts available (Al-Deeb *et al.*, 2012). Generally, phoretic mites are thought to be commensals that disperse with no adverse effects to their hosts (Holte *et al.*, 2001). Our study, like the observations made by Elzinga and Broce (1998), shows how the frontiers between phoretic (commensalistic) and parasitic (trophic negative) interactions is narrow and that the intensity of the phoretic load may determine the neutral or negative impact on host fitness.

4.7 Acknowledgements

We would like to thank Sylvie Bellerose, Franz Vanoosthyuse, Anne-Lyse Laroche, Marie-Pier Richard, Martin Duquette, and Robert Maheux for their assistance in the laboratory and field. We would also like to thank Tracy Leskey and Starker Wright of the United States Department of Agriculture for supplying the Plum Essence, and Mario Fréchette, Jean-Philippe Légaré, and Michèle Roy of the Laboratoire de Diagnostic en Phytoprotection for their help in identifying the mites. These studies were supported by a grant from the Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire de Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) (Québec, Qc.).

4.8 Bibliography

- AL-DEEB, M.A., S.B. MUZAFFAR, A.M. ABUAGLA et E.M. SHARIF (2011). Distribution and abundance of phoretic mites (Astigmata, Mesostigmata) on *Rhyncophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Fla. Entomol.* 94(4): 748-755.
- AL-DEEB, M.A., S.B. MUZAFFAR et E.M. SHARIF (2012). Interactions between phoretic mites and the Arabian rhinoceros beetle, *Oryctes agamemnon arabicus*. *J. Insect Sci.* 12: 128.
- AMIN, M.M., R.F. MIZELL et R.W. FLOWERS (2009). Response of the predatory mites *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae) to pesticides and kairomones of three spider mites species (Acari: Tetranychidae) and non-prey food. *Fla. Entomol.* 92, 554–561.
- AMIS, A., et J.J. SNOW (1985). « *Conotrachelus nenuphar* ». P. Singh et R. F. Moore, (éds.), *Handbook of Insect Rearing*, Vol. 1. New York, Elsevier Science Publishing, p. 227-236.
- BAJERLEIN, D., et J. BŁOSZYK (2004). Phoresy of *Uropoda orbicularis* (Acari: Mesostigmata) by beetles (Coleoptera) associated with cattle dung in Poland. *Eur. J. Entomol.* 101: 185–188.
- BECKAGE, N.E. (2005). Physiological and behavioral host-parasitoid interactions: Future Visions. *Arch. Insect Bioch. Physiol.* 60:151–152.
- BOBB, M. L. (1949). Hibernation of the plum curculio in Virginia. *J. Econ. Entomol.* 42: 19-22.
- BOBB, M.L. (1952). The life history and control of the plum curculio in Virginia. *Bull. W.V. Univ. Agri. Exper. Stat.* No. 453, 30 p.
- BROERSMA, D.B., et S.B. HAYS (1966). Improved methods for mass rearing plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*. *J. Econ. Entomol.* 59(1): 235-236.
- CAPINERA, J.L. (2008). Encyclopedia of Entomology. *Springer Science + Business Media*. B.V.ISBN 978-1-4020-6359-6. 175-176.

- CHOUINARD, G., S.B. HILL, C. VINCENT et N.N. BARTHAKUR (1992a). Border-row sprays for control the plum curculio in apple orchards: behavioural study. *J. Econ. Entomol.* 85: 1307-1317.
- CHOUINARD, G., V. CHARLES, S.B. HILL et P. BERNARD (1992b) Cyclic behavior of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae), within caged dwarf apple trees in spring. *J. Insect Behav.* 5(3): 385-394.
- CHOUINARD G., S.B. HILL et C. VINCENT (1993). Spring behavior of the plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) within caged dwarf apple trees. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 86: 333-340.
- CHOUINARD, G., S.B. HILL et C. VINCENT (1994). Spatial distribution and movements of plum curculio adults within caged apple trees. *Entomol. Exper. App.* 70: 129-142.
- CLARK, J.M. (2010). A new histiostomid mite (Acari: Astigmatina: Histiostomatidae) from blue penguin burrows. *New Zeal. Nat. Sci.* 35: 9-16.
- COOMBS, A. (2001). *Trap designs and attractants for monitoring plum curculio, Conotrachelus nenuphar* (Herbst). Mémoire de maitrise en biology, East Lansing, MI, Michigan State University, 214 p.
- DILIPKUMAR, M., A. AHADIYAT, P. MAŠÁN et T.S. CHUAH (2015). Mites (Acari) associated with *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) in Malaysia, with a revised list of the mites found on this weevil. *J. Asia-Pacific Entomol.* 18: 169-174.
- DIXON, B.M., R.J. PROKOPY et B.B. SCHULTZ (1999). Influence of weather and time of day on plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) tree canopy entry behaviors and evaluation of traps for predicting fruit injury. *J. Entomol. Sci.* 34: 191-202.
- ELLER, F.J., et R.J. BARTELT (1996). Grandisoic acid a male produced aggregation pheromone from the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*. *J. Nat. Prod.* 59: 451-453.
- ELZINGA, R.J., et A.B. BROCE (1988). *Hypopi* (Acari: Histiostomatidae) on house flies (Diptera: Muscidae): a case of detrimental phoresy. *J. Kan. Entomol. Soc.* 61:208-213.

- GARMAN, P., et M.P. ZAPPE (1929). Control studies on the plum curculio in Connecticut apple orchards. *Conn. Agri. Stat. Bull.* 301: 373-437.
- HOCK, V., G. CHOUINARD, E. LUCAS, D. CORMIER, T. LESKEY, S. WRIGHT, A. ZHANG et A. PICHETTE (2014). Establishing abiotic and biotic factors necessary for reliable male pheromone production and attraction to pheromones by female plum curculios *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Can. Entomol.* 146: 528-547.
- HOCK, V., G. CHOUINARD, É. LUCAS, D. CORMIER, T.C. LESKEY, S.E. WRIGHT, A. ZHANG et A. PICHETTE (2015). Behavioral responses of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) to different enantiomer concentrations and blends of the synthetic aggregation pheromone grandisoic acid. *Environ. Entomol.* pp. 549-558. DOI: 10.1093/jee/tov026
- HOFFMANN, E.J., J. VANDERJAGT et M.E. WHALON (2007). Pyriproxyfen reproduction in prediapause northern strain plum curculio (*Conotrachelus nenuphar* Herbst). *Pest Manag. Sci.* 63: 835-840.
- HOLTE, A.E., M.A. HOUCK et N.L. COLLIE (2001). Potential role of parasitism in the evolution of mutualism in astigmatid mites: *Hemisarcoptes cooremani* as a model. *Exper. App. Acarol.* 25: 97-107.
- LAFLEUR, G., et S.B. HILL (1987). Spring migration, within-orchard dispersal, and apple-tree preference of the plum curculio in Southern Quebec. *J. Econ. Entomol.* 80: 1173-1187.
- LE BLANC, J.P.R. (1992). *Trapping and monitoring techniques for plum curculio, Conotrachelus nenuphar* (Herbst), (Coleoptera: Curculionidae) in a southwestern Quebec apple orchard. Mémoire de Doctorat, McGill University, Quebec, Canada.
- MAZZA, G., A. CINI, R. CERVO et S. LONGO (2011). Just phoresy? Reduced lifespan in red palm weevils *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) infested by the mite *Centrouropoda almerodai* (Uroactiniinae: Uropodina). *Ital. J. Zool.* 78: 101-105.
- MULDER, P.G., B.D. MCCRAW, W. REID et R.A. GRANTHAM (1997). *Monitoring adult weevil populations in pecan and fruit trees in Oklahoma*. Oklahoma, Oklahoma State University Extension Facts Stillwater, F-7,190: 1-8.
- NIOGRET, J., J.P. LUMARET et M. BERTRAND (2006). Semiochemicals mediating host-finding behaviour in the phortetic association between *Macrocheles saceri*

- (Acari: Mesostigmata) and *Scarabaeus* species (Coleoptera: Scarabaeidae). *Chemoecology*. 16(3): 129-134.
- PEREAULT, R.J. (2008). *Entomopathogenic fungi and nematodes for Michigan tree fruit management targeting plum curculio (Conotrachelus nenuphar)*. Mémoire de maîtrise en Biologie, Michigan, Michigan State University. 77 p.
- PROKOPY, R.J., S.S. COOLEY et P.L. PHELAN (1995). Bioassay approaches to assessing behavioral responses of plum curculio adults (Coleoptera: Curculionidae) to host fruit odor. *J. Chem. Ecol.* 21(8): 1073-1084.
- RACETTE, G., S.B. HILL, et C. VINCENT (1990). Actographs for recording daily activity of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 83(6): 2385-2392.
- RACETTE, G., G. CHOUINARD, S.B. HILL et C. VINCENT (1991). Activity of adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) on apple trees in spring. *J. Econ. Entomol.* 84: 1827-1832.
- RACETTE, G., CHOUINARD, C. VINCENT et S.B. HILL (1992). Ecology and management of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae), in apple orchards. *Phyto.* 73: 85-100.
- REISSIG, W.H., R.W. WEIRES, G.C. FORSHEY, W.L. ROELOFS, R.C. LAMB et H.S. ALDWINCKLE (1984). Insect management in disease resistant dwarf and semi-dwarf apple trees. *Environ. Entomol.* 13: 1201-1207.
- ROCHA, S.L., E. POZO-VELÁZQUEZ, L.R.D'A. FARONI et R.N.C. GUEDES (2009). Phoretic load of the parasitic mite *Acarophenax lacunatus* (Cross & Krantz) (Prostigmata: Acarophenacidae) affecting mobility and flight take-off of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). *J. Stor. Prod. Res.* 45: 261-211.
- ROY, H.E., D.C. STEINKRAUS, J. EILENBERG, A.E. HAJEK et J.K. PELL (2006). Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Ann. Rev. Entomol.* 51: 331-357.
- SCHEUCHER, R. (1957). « Systematik und Ökologie der deutschen Anoetinen ». Abschnitt II. H.-J. Stammer (eds.). *Beiträge zur Systematik und Ökologie mitteleuropäischer Acarina*, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, pp 233 – 384.

- SCHWARZ, H.H., et J.K. MÜLLER. 1992. The dispersal behaviour of the phoretic mite *Poecilochirus carabi* (Mesostigmata, Parasitidae): adaptation to the breeding biology of its carrier *Necrophorus vespilloides* (Coleoptera, Silphidae). *Oecologia*, 89 (4): 487-493.
- SCHWARZ, H.H., et S. KOULIANOS (1998). When to leave the brood chamber? Routes of dispersal in mites associated with burying beetles. *Exp. Appl. Acarol.* 22: 621-631.
- SIEGEL, S., et N.J. CASTELLAN (1988). *Nonparametric statistics for the behavioural sciences*. 2nd Edition, New York: McGraw-Hill, 399 p.
- SMITH, E.H (1957). A method for rearing plum curculio under laboratory conditions including some biological observations. *J. Econ. Entomol.* 50(2): 187-190.
- SMITH, B.P. (1988). Host-parasite interaction and impact of larval water mites on insects. *Ann. Rev. Entomol.* 33: 487-507.
- SMITH, E.H., et J.K. FLESSEL (1968). Hibernation of the plum curculio and its spring migration to host trees. *J. Econ. Entomol.* 61(1): 193-203.
- SMITH, E.H., et E.H. SALKELD (1964). Ovary development and oviposition rates in the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 57: 781-787.
- THOMPSON, J.R. (1932). Sex differentiation of adults of *Conotrachelus nenuphar*. *J. Econ. Entomol.* 25: 807-810.
- VINSON, S.B., et G.F. IWANTSCH (1980). Host Regulation by Insect Parasitoids. *Q. Rev. Biol.* 55(2): 143-165.
- WHALON, M., D. NORTMAN, J. WISE, L. GUT et D. EPSTEIN (2006). Plum curculio management and spray timing. *Michigan State University Fruit Crop Advisory Team Newsletter*, 21: 1-3.
- WIRTH, STEFAN (2004). *Phylogeny, biology and character transformations of the Histiostomatidae (Acari, Astigmata)*. Mémoire de doctorat. Berlin, Freie Universität.

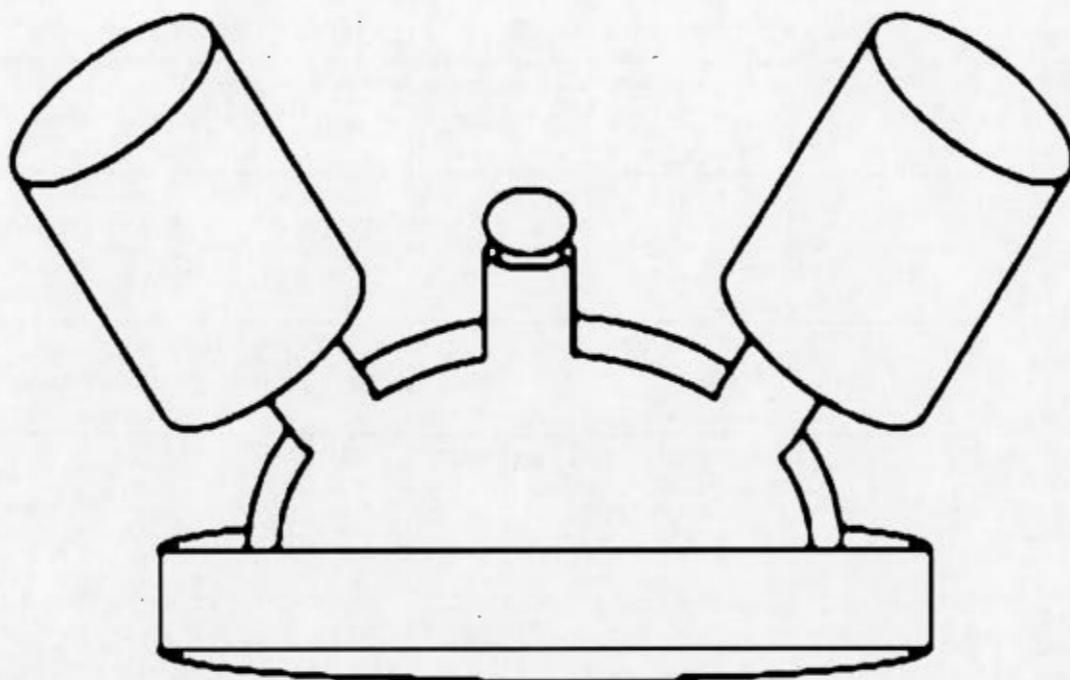


Figure 4.1 Diagram of the olfactometer used in experiments consisting of a Pyrex® glass container with a Petri dish bottom and 3 main apical openings (left, right, center). Lateral openings served as connectors to Mason jars containing either test or control odours; central opening served as the point of introduction for insect.

Table 4.1 Attraction of female plum curculio to odour sources

I. Responders vs. Non-Responders				
Experiment	Mites Treatment	Test Odour	n	Proportion of Females Responding
1A	no mites	Plum essence	40	0.50a
1B	mites	Plum essence	25	0.20b
2A	no mites	2 males	18	0.78a
2B	mites	2 males	24	0.13b
II. Response to Test vs. Control Odours (responders only)				
Experiment	Mites Treatment	Test Odour	n	Proportion of Females Responding
3A	no mites	Plum essence	20	0.75a
3B	mites	Plum essence	5	1.00a
4A	no mites	2 males	14	0.93a
4B	mites	2 males	3	1.00a

I. Proportion of responders (vs. non-responders) for non-infested and infested plum curculio to plum essence and control odours. II. Plum curculio responding to test odours (responders only). n = number of single female choice tests run for 30 minutes during scotophase at 25°C, 70% R.H. Different letters denote significant differences between infested and non-infested plum curculio two-tailed χ^2 test ($P = 0.05$).

CONCLUSION

Sommaire

Les résultats des essais olfactométriques des collectes de phéromone et des électroantennogrammes permettent de mieux comprendre les réponses du CP aux composés olfactifs ainsi que l'émission de la phéromone agrégative. Ces deux facteurs influencent fortement son comportement et conséquemment agissent sur sa survie et son succès reproductif (Butkewich et Prokopy, 1993, 1997; Leskey et Prokopy, 2001). De plus, la compréhension de la communication chimique du CP est cruciale pour la mise en place de stratégies phytosanitaires biologiques efficaces pour lutter contre ce ravageur.

Nous avons atteint notre objectif général, qui était de : a) caractériser l'attraction du CP à la phéromone agrégative, émise naturellement par les mâles, et à d'autres composés olfactifs (Tableau 5.0) et b) déterminer les conditions nécessaires à une émission élevée de la phéromone (Tableau 5.1). Nous avons découvert que l'âge et les conditions physiologiques (tels que le niveau de jeûne et le statut sexuel) du CP affectent sa réponse aux composés olfactifs, et que des femelles vierges, nourries et matures répondent davantage à certains composés olfactifs, et répondent en particulier à l'odeur émise par deux mâles (Hypothèse 1). Aussi, les deux souches du CP répondent différemment à certains composés olfactifs (tels que les énantiomères de l'AG synthétique) (Hypothèse 2). Des conditions abiotiques (telles que l'humidité et la présence d'un abri ou de fruits) ont eu pour effet d'augmenter l'émission de la phéromone et des facteurs biotiques (infestations d'acariens) ont diminué la réponse du CP aux composés olfactifs (Hypothèse 3). Aussi, nous avons démontré un effet de la composition optique et chimique des produits et mélanges sur la réponse du CP aux

composés olfactifs dans l'olfactomètre. L'AG(+) hautement purifié était plus attractif que l'AG(-) ou l'AG(±) et il n'y a pas eu de synergie entre l'AG(+) et les autres composés volatils testés. Finalement, lors de tests électrophysiologiques l'AG(+) a provoqué une réponse des sensilles olfactives présentes sur les antennes (Hypothèse 4) (Tableau 5.1).

Pertinence

Ce projet de recherche a permis d'approfondir les connaissances sur l'écologie et le comportement du CP, un ravageur majeur des vergers de pommiers au Québec et en Amérique du Nord. Les comportements olfactifs du CP (réponses aux odeurs, comme par exemple le nombre de mâles nécessaire pour attirer d'autres charançons) ont été étudiés en présence de substances volatiles présents dans la nature, dans le but ultime de permettre le développement de substances attractives afin de les utiliser dans des pièges à appâts. Les conditions qui provoquent l'émission de la phéromone agrégative par les mâles ont été également étudiées. Ces études nous permettront 1) de progresser vers la détermination de la formule chimique complète de la phéromone agrégative, l'AG étant le seul composé de cette phéromone identifié jusqu'à maintenant, et 2) d'acquérir des connaissances sur le comportement des CP en présence de substances olfactives, dans le but d'aider au développement de meilleures méthodes de dépistage.

Les résultats ont démontré que l'âge et le statut sexuel des femelles charançons jouent un rôle important dans leur attraction vers la phéromone agrégative émise par les mâles (chapitre I). L'attraction des femelles aux groupes de mâles (*p. ex.* deux mâles) peut augmenter les rencontres entre les deux sexes et par conséquent le nombre et la « qualité » des accouplements (les femelles ayant un plus grand « choix » de mâles) (Keitt *et al.*, 2001; Møller et Legendre, 2001; Weldon, 2007) étant donné que le CP

peut s'accoupler plusieurs fois (Johnson et Hays, 1969). Il a également été démontré qu'il existe une quantité optimale de mâles attractifs pour que les femelles soient attirées. À notre connaissance des essais olfactométriques comparant les réponses des deux souches (la souche univoltine du nord et la souche multivoltine du sud) aux mêmes substances volatiles n'avaient encore jamais été menés. Ces tests ont démontré qu'il peut y avoir différentes réponses aux composés olfactifs pour les souches univoltine et multivoltine, ce qui peut affecter les stratégies de lutte à utiliser contre ce ravageur dans la région particulière à chaque souche. De plus les résultats de la collecte de composés volatils produits par le mâle CP ont démontré que celui-ci émet le composé principal de la phéromone agrégative (l'AG) à partir de conditions optimales. Des essais sur les conditions qui favorisent une émission élevée de la phéromone agrégative n'avaient encore jamais été publiés, et cette étude est la première à démontrer la nécessité des conditions de haute humidité et la présence de fruits dans un espace sans refuge ou abri pour l'émission de l'AG. Nos résultats montrent une émission de la phéromone agrégative pendant les premières semaines après la diapause constituant ainsi une nouvelle contribution aux connaissances. Conséquemment, les conditions idéales pour récupérer la phéromones pour l'analyse complète sont de 12 à 20 jours après la diapause en présence d'une humidité élevée et de fruits. Les résultats des électroantennogrammes (EAG) ont également démontré que les mélanges d'acide grandisoïque et de substances volatiles des plantes hôtes tels que les extraits volatils de fruits et de feuilles de prunes stimulent très fortement les récepteurs antennaires du CP. C'est la première fois que la réponse du CP à différentes substances volatiles contenant différents mélanges d'AG comme le grandlure, l'AG en mélange racémique, et surtout l'énantiomère (+) (l'AG(+)), était comparée par EAG. Le fait que le CP puisse répondre à ces mélanges signifie qu'ils peuvent être utilisés dans les appâts de piégeage.

Nos travaux ont également attiré l'attention sur le fait que les deux souches du CP sont attirées par une faible concentration de l'AG(+), la forme synthétique de la phéromone

agrégative qui correspond à celle produite naturellement par les CP, et que la concentration optimale n'est pas identique pour les deux souches (chapitre II). La forme (-) et le mélange racémique de l'AG n'ont pas démontré d'effets attractifs pour le CP à la même concentration testée que l'AG(+). De plus, la quantité d'AG(-) présente dans le mélange synthétique (c'est-à-dire la pureté de l'AG(+)) affecte également la réponse des femelles. Une faible concentration de l'AG hautement purifié (contenant surtout l'énantiomère (+)) pourrait potentiellement être utilisée comme composé attractif dans un piège à phéromone. De tels essais olfactométriques des deux énantiomères évalués à différentes concentrations n'avaient encore jamais été réalisés; ils démontrent pour la première fois l'attraction supérieure de l'énantiomère (+).

Les substances volatiles des plantes hôtes, telles que celles des pommettes et de l'essence de prune se sont révélées attractives pour le CP, mais pas en présence de la phéromone agrégative, qu'elle soit synthétique ou naturelle (chapitre III). Dans le cas de l'essence de prune, ceci peut être dû aux substances volatiles synthétiques utilisées provenant des plantes hôtes, qui sont peut-être moins attractives que les odeurs naturelles, ou parce que l'attraction peut dépendre de la phénologie des plantes hôtes, source des odeurs naturelles utilisées. Certains stades phénologiques des fruits sont plus attirants que d'autres (Leskey et Prokopy, 2000); par exemple le stade du calice correspond à une période durant laquelle les CP sont le plus actifs et se retrouvent en plus grand nombre sur les plantes hôtes. De plus, les fruits lorsque rendus au stade calice contiennent des composés plus attirants que lorsqu'ils sont à d'autres stades (Leskey *et al.*, 2010). Ajoutons que le CP est connu pour être principalement attirés par des substances volatiles de fruits et ensuite seulement par l'odeur d'autres CP (Leskey et Prokopy, 2001). Bien que l'utilisation de ces odeurs dans les appâts soit prometteuse, leur effet comme composé unique dans un piège sera peut-être moins fort que leur effet en combinaison avec d'autres composés volatils. Il faudra trouver la combinaison et la concentration optimales de ces composés volatils qui produisent la plus grande

synergie, s'il y a lieu, afin d'attirer le plus grand nombre de CP. Les futures recherches devraient se concentrer sur l'étude des combinaisons possibles entre l'AG synthétique et les substances émises naturellement par les plantes hôtes, comme par exemple une faible quantité d'AG(+) en combinaison avec des composés olfactifs collectés sur des arbres fruitiers (*p. ex.* le prune « Stanley ») pour trouver un appât pouvant être utilisé durant toute la saison. Cette étude est la première à tester des odeurs synthétiques en combinaison avec l'AG(+) et à démontrer que les réponses peuvent varier en fonction de l'état physiologique du CP.

Nos résultats ont finalement permis d'illustrer l'influence d'autres facteurs biotiques, tel que la présence des acariens phorétiques sur le comportement du CP (chapitre IV). En effet, leur présence sur les CP détermine la capacité de ces derniers à répondre aux odeurs et peut même empêcher le mouvement du ravageur. Cela indique comment la distinction entre commensalisme et parasitisme peut être très difficile à établir. Nos investigations sur l'effet des arthropodes phorétiques sur la réponse du CP aux odeurs attractives ont été publiées dès leur découverte, et elles montrent la complexité des interactions écologiques impliquant cet insecte. C'est également la seule étude à ce jour qui a démontré la présence des acariens du genre de *Histiostoma* sur le CP.

À partir de nos résultats, il est possible de reconstituer l'histoire du CP en verger. Dans la nature le mâle CP sexuellement immature (souche univoltine) et à jeun sort d'hibernation au printemps pour envahir les vergers. Il se nourrit sur les plantes hôtes sauvages mais n'émet pas encore la phéromone agrégative (chapitre I). Les femelles sortent de diapause et sont également sexuellement immatures et à jeun (Lafleur et Hill, 1987; Smith et Flessel, 1968). Les femelles sont attirées par les substances volatiles des plantes hôtes (chapitres III et IV) et l'odeur des mâles (chapitre I, II, IV) qui commencent à émettre la phéromone à dès la huitième journée après leur sortie de diapause (chapitre I). Quand les femelles atteignent leur hôte, elles peuvent être attirées

par des mâles matures qui en sont au stade le plus attractif et qui produisent une plus grande quantité de phéromone agrégative, donc d'AG (chapitre I). Nos résultats indiquent qu'en laboratoire un faible nombre de mâles (deux) (chapitre I) ou d'AG(+) (chapitre II) attire les femelles, et que leurs antennes sont capables de détecter la présence de l'AG(+) (chapitre I), produit par les mâles (chapitre I). En vergers, ces résultats suggèrent que les femelles peuvent détecter l'AG(+) émis simultanément par un plus grand nombre de mâles. Aussi, des taux d'humidité élevés, surtout en présence de fruits, créent des conditions optimales pour l'émission de phéromone (chapitre I). Basé sur ces résultats, il est probable que les CP, lorsque'en grand nombre, émettent plus de la phéromone agrégative et se regroupent dans les vergers. À partir de ces conditions optimales, ils peuvent donc être capturés par des pièges appâtés avec une combinaison de produits volatils attractifs pour le CP (*c.-à-d.* AG(+)) et extraits de prunes ou pommes, etc.).

Pour la souche univoltine qui, par définition, produit une seule génération par année, la nouvelle génération qui émerge vers la fin de l'été n'est pas sexuellement mature mais elle se nourrit tout de même de fruits. Les résultats du chapitre I (bioessais et collectes de phéromone) suggèrent que l'utilisation de phéromone agrégative (chapitres I et II) pendant cette partie de la saison serait moins utile, étant donné que les mâles immatures ne produisent pas d'AG durant cette période et n'attirent donc pas les femelles. Cependant, durant cette même période, les femelles de la souche multivoltine (qui peuvent produire plusieurs générations par année) peuvent être attirées par les mâles (chapitre I) et la phéromone agrégative (chapitres I et II). Donc, parce que les femelles multivoltines répondent aux mâles et à la phéromone pendant presque toute la période de ponte, l'utilisation de la forme synthétique de la phéromone comme outil de dépistage et de lutte pourrait permettre de synchroniser les applications d'insecticides avec les captures de la souche multivoltine pendant presque toute la saison. Des différences entre les réponses des deux souches du CP aux composés

volatils, que nous avons démontré dans cette étude (chapitres I, II et III) ont aussi été démontrées pour d'autres insectes (*p. ex.* la bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae)), surtout par rapport aux phéromones (Messina et Dickinson, 1993; Fletcher *et al.*, 1968). Au plan évolutif, les différentes réponses entre les deux souches du CP peuvent constituer un moyen d'éviter un accouplement infructueux entre individus des deux souches (Padula et Smith, 1971) dans les régions où elles coexistent (Zhang et Pfeiffer, 2008).

En mélange racémique, l'AG est attractif pour le CP dans les vergers, en particulier en combinaison avec des substances volatiles des plantes hôtes (Piñero et Prokopy, 2003), tel que le benzaldéhyde (Piñero *et al.*, 2011; Leskey *et al.*, 2014 – voir Annexe B). L'utilisation de l'AG(+) à la concentration la plus attractive pour chaque souche du CP (chapitre II) pourrait générer une plus grande attraction du CP aux pièges à appâts que la formule utilisée jusqu'à maintenant (l'AG en mélange racémique + benzaldéhyde). Des arbres-pièges pourraient par exemple être appâtés avec 2×10^{-7} mg/mL d'AG(+) (pour la souche univoltine) et de benzaldéhyde juste avant la nouaison (mise à fruit). Afin de développer de meilleurs appâts olfactifs, de nouvelles recherches seront nécessaires qui porteront sur les mélanges à base d'acide grandisoïque pour optimiser l'effet de la phéromone synthétique du CP (*c.-à-d.* l'identification des composés secondaires s'ils existent, comme chez d'autres espèces de charançons). Ainsi, de nouvelles études sont requises pour trouver la meilleure combinaison de composants de la phéromone agrégative synthétique et des plantes hôtes qui résulteraient en des niveaux élevés d'attraction, d'agrégation et de rétention du CP dans les vergers pendant toute la saison.

Les odeurs synthétiques des plantes hôtes pourraient être utilisées prioritairement pour attirer le CP au début de la saison au moment de la sortie de diapause. Selon les résultats du chapitre III (odeurs de plantes hôtes), l'efficacité des odeurs synthétiques des plantes

hôtes peut être moins grande que celle des odeurs naturelles dans certaines conditions (*p. ex.* CP accouplé, à jeun, etc.). Dans les vergers, l'efficacité des odeurs synthétiques de plantes hôtes peut être réduite en présence d'odeurs naturelles, tel qu'observé dans différentes études (Leskey et Wright, 2004a, 2004b; Leskey *et al.*, 2005). Donc, pour obtenir une attraction tout au long de la saison, il faut peut-être envisager d'utiliser l'AG avec différentes substances volatiles des plantes hôtes selon différentes proportions et pendant des périodes différentes. Par exemple, on pourrait imaginer une plus grande quantité d'odeurs naturelles de fruits en début de la saison (alors qu'il y a des odeurs attractives d'arbres des vergers mais pas encore de fruits), une plus grande quantité de phéromone synthétique vers la mi-saison, et de plus grandes quantités d'odeurs de fruits en fin de saison (quand la nouvelle génération d'adultes apparaît, surtout en ce qui concerne la souche univoltine). Puisqu'il y a compétition entre les odeurs du verger (*c.-à-d.* la présence de fruits) et les appâts, une odeur répulsive telle que le trans-2-hexénal à forte concentration (chapitres I et III) pourrait aussi être utilisée pour repousser les CP des arbres vers les pièges (Leskey *et al.*, 2014 – voir Annexe B). Dans cette optique, l'utilisation d'odeurs répulsives pourrait faire partie d'une stratégie attraction-répulsion ('push-pull') (Reddy et Guerrero, 2010).

En plus de l'influence des substances volatiles sur la réponse comportementale du CP (chapitres I à III) et de l'effet des facteurs abiotiques sur l'émission de phéromone (chapitre I), d'autres facteurs environnementaux peuvent influencer le comportement du CP et donc leur éventuelle capture dans des pièges appâtés. Les acariens phorétiques en grand nombre (≥ 10) gênent le mouvement du CP (chapitre IV) et il est possible qu'ils affectent la survie de cet insecte tel que noté chez d'autres coléoptères (Elzinga et Broce, 1988; Capinera, 2008). Un CP se déplaçant au sol (Clark, 2010) risque d'entrer en contact avec des acariens phorétiques qui, s'ils sont présents en petit nombre, n'affecteront pas son mouvement. Cependant, il est possible que des populations d'acariens phorétiques plus importantes réduisent le déplacement du CP

vers les pièges appâtés. Si on prend le coléoptère dendroctone méridional du pin *Dendroctonus frontalis* (Zimm.) (Coleoptera : Curculionidae) comme exemple, il est possible que les acariens aient une grande influence sur leur hôte (Moser, 1976a) et ce coléoptère peut transporter des acariens qui constituent au moins 20% de son poids pendant qu'il vole (Moser, 1976b). Chez le ravageur du palmier dattier *Oryctes agamemnon arabicus* (F.) (Coléoptères : Scarabaeidae), des moyennes de 32 et 45 deutonymphes d'acariens du genre *Sancassania* (Acari: Astigmata: Acaridae) (hypopi) ont été trouvés sur les femelles et les mâles, respectivement, dans la nature, avec un nombre maximal de 3057 acariens trouvé sur un seul scarabaeidé (Al-Deeb *et al.*, 2012). Par conséquent les acariens peuvent exercer un effet significatif sur l'envol (Rocha *et al.*, 2009) et la dispersion par vol des insectes hôtes (Dixon et Osgood, 1961; Elzinga et Broce, 1988; Beresford et Sutcliffe, 2009). Donc, en fonction de la taille de la population et du niveau de l'infestation, la présence d'acariens phorétiques peut entraîner des répercussions importantes sur la dispersion du CP dans la nature. Il est fort possible que les CP rencontrent des populations d'au moins de 10 à 20 acariens sous des conditions normalement présentes dans la nature, ce qui est suffisant pour affecter leur mobilité (chapitre IV). Néanmoins, la réelle influence des acariens phorétiques sur le CP, en fonction de leur fréquence et leur nombre, sur le CP en vergers reste à déterminer.

Cette étude peut également permettre l'avancement des connaissances sur d'autres espèces d'insectes dans l'identification de : 1) substances volatiles attractives; 2) conditions abiotiques et biotiques pour l'émission d'un taux élevé de la phéromone et 3) arthropodes phorétiques pouvant influencer le comportement de déplacement des insectes ciblés. Le CP est comparable à d'autres charançons tel que le charançon du coton, l'anthonome du fraisier et le charançon du poivron car ils répondent tous au grandlure et qu'ils se retrouvent dans un climat tempéré et produisent une phéromone agrégative (par les mâles) constituée de plusieurs composantes (Turnlinson *et al.*, 1969;

Innocenzi *et al.*, 2001; Eller *et al.*, 1994; Addesso et McAuslane, 2009). Chez ces charançons et d'autres, reconnus pour produire une phéromone agrégative, les expériences décrites au chapitre I peuvent être effectuées afin d'identifier d'autres composés secondaires de la phéromone *p.ex.* : celle du charançon du bananier, *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera : Curculionidae) (Mori *et al.*, 1996; Tinzaara *et al.*, 2007). Les expérimentations peuvent être utilisées également pour d'autres charançons tels que le charançon du pseudotrunc du bananier *Odoiporus longicollis* Olivier (Curculionidae: Coleoptera) (Prasuna *et al.*, 2008), le rhynchite rouge du pommier *Rhynchites aequatus* (L.) (Curculionidae: Coleoptera) (Bolu, 2006) et le balanin des châtaignes, *Curculio sayi* Gyllenhal (Curculionidae: Coleoptera) (Keesey et Barrett, 2012) afin de préciser les conditions biotiques et abiotiques propices à l'émission de la phéromone (*p. ex.* des conditions d'humidité élevée, l'absence d'abri, et la présence de fruits (chapitre I)). Il est probable que d'autres charançons similaires aient une réponse comparable à celle du CP (*p.ex.* répondre davantage à l'énantiomère naturel hautement purifié et à faible concentration (chapitre II)). Il est aussi plausible de penser que l'utilisation d'insectes matures et vierges mène à de meilleurs résultats pendant les tests olfactométriques ou comportementaux, étant donné que c'est ce qui se produit dans le cas du CP (chapitre I). De plus, l'utilisation des composés volatils qui correspondent le mieux au stade phénologique de leur hôte préféré pourrait donner de meilleurs résultats (chapitre III). Conséquemment, l'utilisation des charançons matures et vierges, additionnée d'une faible concentration de l'énantiomère naturel, et/ou des composés volatils naturels de plantes hôtes au stade phénologique le plus attractif selon des conditions d'humidité élevée, constitue un bon départ pour effectuer des essais sur d'autres charançons nuisibles dans la perspective d'une lutte plus efficace contre ces insectes ravageurs durant toute la période où ils causent des dommages (sans devoir effectuer un grand nombre d'expériences ou de refaire chaque expérience décrite dans la présente recherche).

De façon globale, cette recherche aura démontré que le CP émet une phéromone agrégative d'une manière qui varie en fonction de sa condition physiologique et des conditions environnementales (humidité, température, etc.). Le CP possède des récepteurs olfactifs qui permettent la détection de composés volatils comme la phéromone synthétique ainsi que les odeurs des plantes hôtes, qu'il s'agisse de composés considérés attractifs (comme l'odeur de la prune 'Stanley') ou répulsifs (comme le trans-2-hexénal). Comme chez d'autres insectes, les résultats indiquent que les adultes peuvent être attirés par plusieurs composés volatils synthétiques (retrouvés chez les plantes hôtes et dans la phéromone de l'insecte), et naturels (émis par les mâles et les plantes hôtes) et que la réponse varie selon l'odeur (composé, taux d'émission, etc.) ainsi que le statut physiologique (niveau de jeûne, le statut sexuel, etc.) du CP. Ces connaissances sont importantes car elles décrivent les conditions qui favorisent une émission élevée de la phéromone, ce qui facilite la collecte et l'analyse de cette phéromone et permet de rechercher des composés secondaires. De plus, ces connaissances décrivent des conditions (comme le type d'odeurs) dans lesquelles les CP pourraient être davantage attirés par des pièges appâtés ou pourraient au contraire être limités ou empêchés de rejoindre les odeurs attractives (*p.ex.* : phorésie par les acariens, faible taux d'humidité, etc.).

Les résultats de cette étude sont susceptibles d'influer, premièrement, sur la pratique en laboratoire lors des recherches futures portant sur des essais olfactométriques, des collectes de phéromones et des tests électrophysiologiques. Ces recherches permettront d'améliorer nos connaissances sur la physiologie, la biologie, le comportement et l'écologie chimique du CP et/ou d'autres espèces. Deuxièmement, ces résultats autoriseront le développement dans les vergers de pièges à appâts plus efficaces, de nouvelles stratégies de dépistage et de lutte phytosanitaire et enfin l'obtention de meilleures connaissances de l'écologie du CP. Des essais en vergers avec des pièges à appâts utilisant une ou plusieurs des odeurs attractives mentionnées dans cette étude

seront nécessaires afin de valider les résultats obtenus en laboratoire. Ils pourraient aider à optimiser l'efficacité des pièges et permettre le développement d'autres méthodes de lutte (*p.ex.* attracticide). Enfin, troisièmement et de manière indirecte, les résultats fourniront une base de connaissances sur lesquelles des tests en laboratoire et dans la nature pourront être effectués avec des insectes similaires, en particulier d'autres charançons, ou pour des insectes émettant une phéromone agrégative et qui peuvent répondre au grandisol. Cela pourrait avoir un grand impact, non seulement au Québec et dans l'industrie pomicole, mais également là où l'on trouve des ravageurs similaires (*p.ex.* : les charançons de climat tempéré) et conduire à épargner des millions de dollars annuellement en applications de pesticides préventifs ou mal ciblées (MacRae *et al.*, 2006).

Tableau 5.0 Sommaire des résultats des expériences olfactométriques

Tests olfactométriques		Réponses des souches	
État physiologique des femelles	Odeur	Univoltine	Multivoltine
Vierges, nourries, matures	1 mâle	Neutre	Neutre
Vierges, nourries, matures	2 mâles	Attractif	Attractif
Vierges, nourries, matures	5 mâles	Neutre	Répulsif
Vierge, nourrie, immature / âgé	2 mâles	Neutre	Neutre
Accouplées, nourries, matures	2 mâles	Neutre	Neutre
Vierges, nourries, matures	72% AG(+)	Attractif à 2×10^{-7} mg/mL	Attractif à 2×10^{-9} mg/mL
Vierges, nourries, matures	66.8% AG(-)	Répulsif à 0.2 mg/mL	Répulsif à 2×10^{-9} mg/mL
Vierges, nourries, matures	Toute autre concentration de 72% et 51.6% ee AG(+), 66.8% ee AG(-) et AG(\pm)	Neutre	Neutre
Vierges, nourries, immatures / âgées	essence de prune	Neutre	Non applicable
Vierges, nourries, matures	essence de prune	Attractif	Attractif
Vierges, matures, à jeun (24 / 48 / 72 h)	essence de prune	Neutre	Neutre (24 et 48 h), attractif (72 h)
Accouplées, nourries, matures	essence de prune	Neutre	Non applicable
Vierges, matures, à jeun (24 h)	essence de prune	Neutre	Neutre
Vierges, nourries, matures	Ester de pomme, ester de pomme McIntosh, ester de bleuet	Neutre	Non applicable
Vierges, nourries, matures	Trans-2-hexénal	Répulsif	Non applicable
Vierges, nourries, matures	benzaldéhyde	Non applicable	Répulsif
Vierges, nourries, matures	benzaldéhyde et essence de prune	Non applicable	Répulsif
Vierges, nourries, matures	5 pommettes	Neutre	Neutre
Vierges, nourries, matures	5 pommettes perforées	Neutre	Neutre
Vierges, matures, à jeun (24 h)	5 pommettes	Attractif	Neutre
Vierges, matures, à jeun (24 h)	5 pommettes perforées	Attractif	Neutre
Vierges, nourries, matures	72% ee AG(+ et essence de prune	Neutre à 2×10^{-7} mg/mL	Non applicable
Vierges, matures, à jeun (72 h)	72% ee AG(+ et essence de prune	Répulsif à 2×10^{-7} mg/mL	Non applicable
Vierges, nourries, matures	2 mâles et essence de prune	Neutre	Neutre
Vierges, nourries, matures	2 mâles et 5 pommettes	Neutre	Neutre
Vierge, mature, et à jeun (24 h)	2 mâles et 5 pommettes	Neutre	Neutre

AG(+): l'énantiomère (+) de l'acide grandisoïque; AG(-): l'énantiomère (-) de l'acide grandisoïque; AG(\pm): mélange racémique de l'acide grandisoïque; ee: excès énantiomérique.

Tableau 5.1 Sommaire des résultats des expériences de collecte de substances volatiles de la phéromone (headspace) et des expériences électrophysiologiques

Collectes de substances volatiles de la phéromone (headspace)		Résultats selon la souche	
État physiologique des mâles	Condition	Univoltine	Multivoltine
Vierges, nourries, matures	Humidité élevée (75%)	Non applicable	Augmentation d'émission
Vierges, nourries, matures	Présence de fruits	Non applicable	Augmentation d'émission
Vierges, nourries, matures	Absence d'abris	Non applicable	Augmentation d'émission
Vierges, nourries, matures	Faible humidité (15%, 25%), température et humidité élevée (30°C et 75% R.H.) ou faible (20°C et 25% R.H.), niveau des strates de collectes (haute/bas), niveau de débit d'air (0.5 L/min, 1 L/min)	Non applicable	Pas d'augmentation d'émission
Vierges, nourries, matures	Âge des mâles (débit d'air aléatoire / constant)	Non applicable	Augmentation d'émission à 8-26 jrs (pic à 12-16 jrs)

Tests électrophysiologiques		Détection des substances volatiles selon la souche	
État physiologique des femelles	Composé	Univoltine	Multivoltine
Vierges, nourries, matures	Grandlure (I, II, III/IV)	Non applicable	Oui
Vierges, nourries, matures	L'AG(+) et l'AG(±)	Non applicable	Oui
Vierges, nourries, matures	Trans-2-hexénal	Non applicable	Oui
Vierges, nourries, matures	Odeur de prune 'Stanley'	Non applicable	Oui

AG(+): l'énantiomère (+) de l'acide grandisoïque; AG(±) : mélange racémique de l'acide grandisoïque.

ANNEXE A

OLFACTOMÈTRE À QUATRE VOIES

Afin de vérifier la sensibilité du CP à différentes odeurs, des essais ont été initialement réalisés à l'aide d'un olfactomètre à quatre voies pour déterminer la réponse olfactive des femelles à plusieurs odeurs simultanées. L'olfactomètre utilisé était celui décrit par Vigneault *et al.* (1997) avec les modifications de Cormier *et al.* (1998), tel que vu dans Hock *et al.* (2009a). Il s'agissait d'une enceinte en forme d'étoile d'une hauteur de 6,35 mm permettant le mouvement de l'insecte mais pas le vol et comportant quatre zones (branches) reliées chacune à un tube autorisant l'utilisation simultanée de quatre sources d'odeurs (incluant un témoin) ou d'un gradient de la même odeur. Au centre de l'olfactomètre se trouvait une ouverture de 10 mm de diamètre par laquelle s'échappait le flux d'air et par laquelle également étaient introduits les insectes récepteurs. Puisque les expériences étaient faites pendant la scotophase, deux lampes néons (40W) recouvertes d'un filtre rouge (LEE Filtre, rouge primaire no. 106®, Son-Art Production, Saint Hyacinthe, Québec, Canada) étaient utilisées pour fournir l'éclairage nocturne sans perturber les insectes sous expérimentation (Prokopy *et al.*, 1995). Une caméra vidéo dans la chambre d'observation (couleur noire, taille de 104.3 x 76 x 74.3 cm) était reliée à un ordinateur muni du logiciel Observer® (Noldus Information Technology, 1997). Ce logiciel permettait d'enregistrer le comportement des adultes du CP dans l'olfactomètre. Toutes les expériences olfactométriques étaient accomplies à la température de la pièce (environ $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) et à une humidité relative d'environ 70%. Différentes sources d'odeurs (mâles vivants, phéromone synthétique, extraits de plantes hôtes) ainsi que différents paramètres (débits d'air, durée de réponse, taux d'humidité, statut sexuel des femelles, différents nombres de mâles émetteurs, etc.) ont été comparés pour chaque souche du CP. Malheureusement, aucune réponse cohérente n'a été obtenue lors des essais. Parmi les hypothèses soulevées pour

expliquer ces résultats figurent l'effet combiné du comportement typique de thanatose de cet insecte (pouvant avoir causé de la réticence à se déplacer dans les conduits de l'olfactomètre) et du stress (pouvant provoquer un comportement de fuite). Ces deux comportements ont été fréquemment observés au cours des essais avec cet olfactomètre. La faible hauteur de l'olfactomètre est ainsi apparue inadéquate pour l'étude de cet insecte. Des perturbations similaires à celles observées avec notre olfactomètre à quatre voies ont été également notées lors d'essais avec un petit olfactomètre à deux voies en forme de « Y » pour le CP (V. Hock, non publié; Dr. A. Zhang, communication personnelle, 19 septembre 2009).

Un olfactomètre à deux voies plus grand et plus simple a donc été développé puis utilisé pour réévaluer la réponse du CP aux odeurs précédemment testées. Une réponse positive et cohérente à l'essence de prune a été obtenue lors d'essais préliminaires, avec des résultats qui s'approchaient de ceux obtenus par Leskey et Prokopy (2001) et Akotsen-Mensah (2010). Des réponses cohérentes ont aussi été obtenues avec des femelles en présence d'odeurs de mâles. À la vue de ces résultats, et après deux ans d'essais infructueux avec l'olfactomètre à quatre voies, la décision a été prise de le remplacer par l'olfactomètre à deux voies, ceci pour tout le projet.

Des expériences ont été effectuées dans l'olfactomètre à deux voies pendant différentes heures de la scotophase et aussi avec un composé secondaire présent dans la phéromone d'agrégation du CP, retrouvé lors des collectes des composés volatils selon la technique du « headspace » (Dr. A. Zhang, communication personnelle, 19 septembre 2009). Ce composé (un ester de méthyle) a été testé à différentes concentrations et en combinaison avec l'AG. Aucune attraction significative n'a été observée lors des essais avec ce composé. Pour la plupart de ces tests il n'y avait pas de différence entre les réponses aux odeurs pendant les différentes heures (un à huit) de la scotophase.

Les résultats de cette recherche ont été présentés dans de nombreux congrès, tels que celui de la Société d'entomologie du Québec (SEQ) (Hock *et al.*, 2009b), Entomological Society of America (ESA) (Hock *et al.*, 2009c; Leskey *et al.*, 2010), les Journées Annuelles sur la recherche et l'innovation technologique du Réseau-pommier (Hock *et al.*, 2011) et la réunion conjointe annuelle de la Société d'entomologie du Canada (SEC) et de la Société d'entomologie de l'Alberta (Hock *et al.*, 2012).

Bibliographie

- AKOTSEN-MENSAH, C. (2010). *Ecology and management of plum curculio, Conotrachelus nenuphar (Coleoptera: Curculionidae) in Alabama Peaches*. Mémoire de Doctorat, Auburn University, Alabama, USA. 180 p.
- CORMIER, D., L. ROYER, C. VIGNEAULT, B. PANNETON et G. BOIVIN (1998). Effect of female age on daily cycle of sexual pheromone emission in gregarious egg parasitoid *Anaphes listronoti*. *J. Chem. Ecol.* 24(10): 1595-1609.
- HOCK, V. (2009a). Odours, bringing pest control in orchards to fruition. *Bull. Soc. Entomol. Qc. Antenn.* 16(3): 3-6.
- HOCK, V., G. CHOUINARD, É. LUCAS, D. CORMIER, T. C. LESKEY, S.E. WRIGHT et A. ZHANG (2009b). "Olfactometer experiments on the plum curculio *Conotrachelus nenuphar* (Herbst.) (Coleoptera: Curculionidae) response to the aggregation pheromone emitted by male plum curculio." L'Hôtel Relais Gouverneur de St-Jean-sur-Richelieu, St-Jean-sur-Richelieu, Qc., Canada. 5-6 nov. 2009.
- HOCK, V., G. CHOUINARD, É. LUCAS, D. CORMIER, T.C. LESKEY, A. ZHANG et A. PICHETTE (2009c). "Response of plum curculio to artificial volatiles and to conspecifics." Indiana Convention Center in Indianapolis, IN., É-U. 15 dec. 2009.
- HOCK, V., G. CHOUINARD, D. CORMIER, É. LUCAS, T.C. LESKEY, A. ZHANG et S.E. WRIGHT (2011). Étude du comportement du charançon de la prune *Conotrachelus nenuphar* (Herbst), en présence d'odeurs synthétiques et naturelles. 19ème Journées annuelles sur la recherche et l'innovation technologique; Groupe d'experts en protection des pommiers, Orford, QC, Canada. 2 et 3 fév. 2011.
- HOCK, V., G. CHOUINARD, D. CORMIER, É. LUCAS, T. LESKEY, A. ZHANG et S.E. WRIGHT (2012). "Olfactometric responses of Plum curculio to natural and synthetic volatiles / Les réponses olfactométriques du charançon de la prune aux substances volatiles naturelles et synthétiques." Coast Edmonton Plaza Hotel, Edmonton, AB., Canada. 5 nov. 2012.

- LESKEY, T.C., et R.J. PROKOPY (2001). Adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) attraction to fruit et conspecific odors. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 275-288.
- LESKEY, TRACY C., S.E. WRIGHT, V. HOCK, G. CHOUINARD, D. CORMIER et A. ZHANG (2010). "Improving Methods for Chemical Ecology Studies of the Plum Curculio." Town and Country Hotel and Convention Center, San Diego, CA., É-U. 15 dec. 2010.
- PROKOPY, R.J., S.S. COOLEY et P.L. PHELAN (1995). Bioassay approaches to assessing behavioral responses of plum curculio adults (Coleoptera: Curculionidae) to host fruit odor. *J. Chem. Ecol.* 21(8): 1073-1084.
- VIGNEAULT, C., B. PANNETON, D. CORMIER et G. BOIVIN (1997). Automated system to quantify the behavior of small insects in a four-pointed star olfactometer. *App. Engen. Agrcult.* 13: 545-550.

ANNEXE B

EVALUATING ELECTROPHYSIOLOGICAL AND BEHAVIORAL RESPONSES OF VOLATILES FOR IMPROVEMENT OF ODOR-BAITED TRAP TREE MANAGEMENT OF *CONOTRACHELUS NENUPHAR* (HERBST) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

La contribution suivante intitulée: « Evaluating Electrophysiological and Behavioral Responses of Volatiles for Improvement of Odor-Baited Trap Tree Management of *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) » été réalisée à la suite d'un stage au États-Unis dans le cadre de mon projet d'étude. Les noms des auteurs sont, dans l'ordre : Tracy C. Leskey¹, Starker E. Wright¹, Virginia Hock², Gérald Chouinard², Daniel Cormier², Kathleen Leahy³, Daniel Cooley⁴, Arthur Tuttle⁴, Alan Eaton⁵, and Aijun Zhang⁶. Lors du stage, des études électrophysiologiques faisant appel à des techniques d'électroantennogramme (EAG) ont été réalisées, couplé avec la chromatographie en phase gazeuse (GC-EAD) et des collectes de produits volatils (« headspace collections »). Une partie de ces résultats apparaissent dans l'article suivant, publié en 2014 dans la revue « Environmental Entomology » volume. 43, pp. 753-761.

¹ USDA-ARS, Appalachian Fruit Research Station, 2217 Wiltshire Road, Kearneysville, WV 25430-2771 USA

² Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement (IRDA), 3300 Sicotte, CP 480, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 7B8 Canada

³ Polaris Orchard Management, Colrain, MA 01340

⁴ University of Massachusetts at Amherst, Amherst, MA 01002

⁵ University of New Hampshire, Durham, NH 03824

⁶ USDA-ARS, Invasive Insect Behavior and Biocontrol Laboratory, BARC-W, 10300 Baltimore Ave, Beltsville, MD 20705

Résumé

Le charançon de la prune, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst), est l'un des ravageurs les plus importants de la pomme dans l'est et le centre de l'Amérique du Nord. Sa présence dans les vergers de pommiers de Nouvelle-Angleterre a toujours été gérée par trois applications annuelles d'insecticides. Les efforts visant à réduire l'utilisation des insecticides contre cet insecte comprennent la stratégie d'attraction-répulsion («attract and kill») employant des appâts olfactifs déployés sur des arbres-pièges dans la rangée périphérique des vergers. Dans ce cas, les pommiers sont appâtés avec des stimuli olfactifs, *c.-à-d.* le benzaldéhyde et la phéromone agrégative du charançon de la prune, l'acide grandisoïque. Nous avons tenté d'améliorer l'attraction, l'agrégation et la rétention des adultes du charançon de la prune dans les arbres-pièges d'un verger de pommiers en utilisant un composé volatil des plantes hôtes ayant élicité de fortes réponses du charançon dans des études de EAG, le trans-2-hexénal. Nous avons également tenté d'augmenter l'agrégation en augmentant les taux de diffusion de l'acide grandisoïque. Le trans-2-hexénal n'a pas augmenté l'agrégation lorsqu'il a été déployé comme un attractif supplémentaire dans les arbres pièges, ni lorsqu'il a été déployé comme un répulsif dans les arbres périphériques voisins des arbres-pièges. De plus, l'augmentation du taux de diffusion de l'acide grandisoïque a plutôt réduit l'agrégation dans les arbres-pièges et a augmenté l'agrégation dans les arbres voisins les plus proches. Par conséquent, nous croyons que les stimuli olfactifs « standards » sont suffisants pour permettre l'agrégation des charançons dans les arbres-pièges, mais que d'autres moyens doivent être utilisés pour les gérer après qu'ils se soient accumulés dans les arbres-pièges

MOTS-CLÉS: électroantennogramme, charançon, EAG, phéromone, attractif

Abstract

Plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst), one of the most important pests of apple in eastern and central North America, historically has been managed in New England apple orchards by three full block insecticide applications. Efforts to reduce insecticide inputs against plum curculio include using an 'attract and kill' approach; odor-baited trap trees deployed in the perimeter row of apple orchards. In this case, apple trees are baited with two olfactory stimuli, the fruit volatile, benzaldehyde and the aggregation pheromone of plum curculio, grandisoic acid. We attempted to improve attraction, aggregation, and retention of adult plum curculios within specific baited trap tree canopies within apple orchards using a host plant volatile found to be highly stimulating in EAG studies, trans-2-hexenal. We also attempted to increase aggregation using increased release rates of grandisoic acid. We found that trans-2-hexenal did not provide increased aggregation when deployed as an additional attractant within trap trees or as a 'push' component in perimeter trees lateral to the baited trap tree. Additionally, increasing the release rate of grandisoic acid actually appeared to reduce overall aggregation within trap trees and increase aggregation in nearest neighbor trees. Therefore, we believe that the standard olfactory stimuli are sufficient to provide aggregation within trap trees, but that other means should be used to manage them after their arrival.

KEY WORDS: electroantennogram, weevil, EAG, pheromone, attractant

Introduction

The plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst), is one of the most important insect pests of pome and stone fruit in eastern and central North America (Vincent *et al.*, 1999; Vincent *et al.*, 2004; Leskey *et al.*, 2009a). In the northeastern United States, the plum curculio has been managed by applying three full block applications of an organophosphate insecticide (Koehler, 2003) in the absence of monitoring tactics. After petal fall, however, the question as to need for and timing of subsequent insecticide applications made against plum curculio has been difficult for growers to pinpoint because of lack of a reliable monitoring technique. Over the past decade, a trap tree monitoring strategy for plum curculio oviposition activity has been developed (Prokopy *et al.*, 2003, 2004) and validated in seven northeastern states (Piñero *et al.*, 2011). This approach calls for baiting apple trees in the perimeter row with a synergistic two-component lure (Piñero and Prokopy, 2003) comprised of the synthetic host plant-derived volatile benzaldehyde and the synthetic male-produced aggregation pheromone grandisoic acid (Eller and Bartelt, 1996). This trap tree is subsequently monitored for signs of fresh oviposition injury, thereby allowing growers to determine the need for and timing of subsequent insecticide applications (Piñero *et al.*, 2011).

More recently, this novel approach was applied as a management tool for plum curculio. In this case, the baited trap tree was used to aggregate plum curculios in specific baited perimeter-row trees. Then by applying insecticides to only those baited trap trees located on the periphery of apple orchards rather than the entire orchard (after petal fall), tremendous reductions in the amount of insecticide applied were achieved without compromising plum curculio control. This strategy resulted in a ~70% and 93% reduction in the total percentage of trees treated with insecticide compared with perimeter row sprays and standard whole-orchard sprays, respectively. Commercially acceptable control was achieved in the majority of collaborating grower orchards, and

no differences in injury rates were detected between trap-tree managed plots and perimeter-row managed plots (Leskey *et al.*, 2008).

This spatially precise approach, while reasonably effective, demands refinement, however, based on elevated injury found in unbaited trees directly adjacent to baited trap trees (Leskey *et al.*, 2008). Aggregation and subsequent injury by adult plum curculios was significantly greater and encompassed an area larger than just the single trap-tree canopy. Instead, oviposition injury (indicative of increased adult aggregation) occupied an area that included the trap tree and several nearest neighbor trees adjacent to the trap tree and has been referred to as the trap tree zone. A likely explanation for this exaggerated aggregation zone involves the level of precision offered by current olfactory stimuli being deployed to attract, aggregate, and retain plum curculios within a particular location.

Olfactory cues are important components of host- and mate-finding for this species as it moves from overwintering sites at the periphery of orchards into host trees (Smith and Flessel, 1968; Lafleur and Hill, 1987; Piñero *et al.*, 2001). Adult antennae possess sensilla types consistent with those known to be olfactory receptors in other insects, including those thought to be for pheromone reception (Alm and Hall, 1986). Volatile collections from virgin multivoltine male plum curculios have yielded a single compound termed grandisoic acid. This compound is attractive to both males and females, and therefore is considered an aggregation pheromone (Eller and Bartelt, 1996). Behavioral studies also have demonstrated that plum curculios use olfactory cues to locate host fruit trees (Butkewich and Prokopy, 1993; Leskey and Prokopy, 2001). Several compounds identified from apple (Boevé *et al.*, 1996; Leskey *et al.*, 2001) and plum (Leskey *et al.*, 2001) were found to be attractive in the laboratory and field (Leskey *et al.*, 2001; Leskey and Wright, 2004a; Prokopy *et al.*, 2001). When benzaldehyde in particular was evaluated in combination with grandisoic acid, plum

curculio captures in traps increased significantly compared with captures in traps baited with grandisoic acid alone or in unbaited traps (Piñero *et al.*, 2001). Benzaldehyde is the only fruit volatile that has been demonstrated to synergize plum curculio responses to grandisoic acid (Piñero and Prokopy, 2003). This synergistic response, an increase in attractiveness when host plant volatiles are combined with an aggregation pheromone, is common among weevil species (Landolt, 1997; Landolt and Phillips, 1997). However, as the trap-tree strategy has revealed (Leskey *et al.*, 2008), the current blend of olfactory attractants (benzaldehyde in combination with grandisoic acid) may not be a sufficient olfactory stimulus to competitively attract, aggregate, and retain adult plum curculios within specific baited trap tree canopies within apple orchards.

Recently, we developed a reliable electroantennogram (EAG) technique for plum curculio (Leskey *et al.*, 2009b) that will enable us to utilize electrophysiological responses to facilitate identification of stimulating volatiles for plum curculio. Their identity could prove very important as single-component fruit-based attractants may be less competitive within the context of an orchard when the attractant itself is released by developing fruit. For example, although benzaldehyde was identified from plum (Leskey *et al.*, 2001), it also is produced by apple blossoms (Buchbauer *et al.*, 1993), and Leskey and Wright (2004b) demonstrated that when traps baited with this compound were deployed within close proximity of host fruit trees, significantly fewer adults were captured compared with traps deployed in an area without competing host fruit trees. A multiple-component olfactory attractant for the apple maggot, *Rhagoletis pomonella* (Walsh), identified from apple volatiles was found to be a much more attractive than a single component bait under field conditions (Zhang *et al.*, 1999). Thus, it seems reasonable that a host plant-based attractant comprised of multiple components would be more competitive in the field and thus more attractive to plum curculios, aggregating and retaining greater numbers within specific trap trees.

Therefore, we evaluated electroantennogram responses of plum curculio to a number of host plant volatiles in the laboratory. Those found to be highly stimulating in the laboratory were evaluated in the field in commercial apple orchards to determine if they could improve the overall level of aggregation, and retention of plum curculios in odor-baited trap trees. In addition, grandisoic acid release rates also were manipulated in baited trap trees to determine if a higher rate would improve efficacy of this strategy.

Materials and Methods

EAG studies

Source females

Plum curculios used as test subjects in EAG trials designed to evaluate host odor stimuli were taken from a laboratory colony established in 2001 at the Appalachian Fruit Research Station (Kearneysville, WV) and augmented annually with wild individuals. Plum curculios were reared in the laboratory on a diet of green thinning apples based following Amis and Snow (1985). Newly emerged adults were held in an environmental chamber at 25 °C and 14L:10D in mixed-sex groups of 100-300 individuals with a source of food and water (green thinning apples and wetted cotton dental wick) for two weeks to allow for sexual maturation and mating. Mature adults were then removed from the chamber and sexed following Thomson (1932) prior to testing; only females were used in these trials, because EAG responses to fruit odours are statistically higher for females compared with males (Leskey *et al.*, 2009b) and

sexually mature females are considered to be the most damaging portion of the population.

Odor treatments

Treatments included evaluation of the four synthetic volatiles: ethyl acetate, ethyl butyrate, trans-2-hexenal, and R (+)-limonene coupled with a dichloromethane (DCM) solvent control and a standard ('Stanley' plum at 20 mm fruit). These synthetic volatiles were chosen because they are released by fruiting, foliar and/or woody tissues of *Prunus domestica*, European plum, var. 'Stanley' and 'Fellenberg' and have elicited differing behavioral responses from plum curculio in laboratory and field settings (Table 1). Each of the synthetic volatiles was evaluated at 5 concentrations: 10.0 1.0, 0.1 0.01, and 0.001 mg/mL diluted in DCM. The 'Stanley' plum standard, found to be highly stimulating in previous studies and was produced according to the protocol described in Leskey *et al.* (2010). Briefly, large polyethylene bag (48.26 x 58.42 cm, Reynolds Oven Bags, Richmond VA) was used as a source containment device; bags were placed over four selected 'Stanley' plum branches of equal volume (*i.e.* similar size, architecture, and abundance of plant tissue). The open end of each bag was sealed with plastic ties tightened around the branch stem; for ventilation, two 0.7 cm holes were made near the tip of each bag with a standard hole punch. Air was drawn out of each bag by vacuum (~1.0 L/min) through a glass tube (15 x 1.5-cm Ø) containing a Super Q-filled trap (2.5 x 0.5 cm, 200 mg each; Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL) positioned on the branch at the base of the open end of the bag prior to the bag being sealed. Bags were aerated continuously for 48h under ambient field conditions. Collected volatiles were eluted with DCM; eluates (2 mL/each sample tube) were stored at -30 °C until evaluation.

EAG protocol

Subject females were immobilized in a custom polycarbonate insect holder (Leskey *et al.*, 2009b). The recording and indifferent electrodes were produced from 1.0 mm (\varnothing) capillary glass (World Precision Instruments, Sarasota, FL) using a Model P.80/PC Flaming Brown Micropipette Puller (Sutter Instrument Co, Novato, CA) and based on a modified 'bee-stinger' tip program (heat = 370-410, pull = 0, velocity = 15-25, time = 150; 3-6 loops) (Leskey *et al.*, 2009b). The indifferent electrode was filled with diluted reference electrode solution (diluted from 4.0 M KCl saturated AgCl to 0.4 M) and inserted through a port in the top of the insect holder through the exposed membrane attached to the ventral cervical sclerite between the thorax and the head. The recording electrode was similarly filled with electrode solution and inserted through a port at the rear of the holder into the mid-point (between segments 2-3) of the immobilized 4-segmented antennal club (this region of the antenna has the highest concentration of potential olfactory receptors) (Alm and Hall, 1986).

Baseline output signal from antennae of individual plum curculios was observed and allowed to stabilize for up to 10 minutes. Individual female plum curculios exhibiting output baseline variation (noise) of greater than ± 25 mV were not tested (10% of those mounted). After baseline stabilization, the insect holder was inserted into a 16 mm \varnothing cylindrical port at the terminus of a moving air stream, and clean air was passed across the recorded antenna at 1000 mL per minute. A stimulus cartridge was prepared for each odour stimulus treatment. Briefly, 50 μ L solution from the 8 mL parent extract was dispensed onto a filter paper strip (Whatman Grade 3 filter paper, 75 mm x 6 mm, Whatman Inc., Piscataway, NJ), the solvent was evaporated completely, the strip was loaded into a glass Pasteur pipette, and mounted on a 10 mL syringe. Preparation of

stimulus cartridges was repeated every 2 hours during test periods. A rotation of 2 mL puffs of each tested stimulus was injected by hand into the clean air stream through an orifice 15 cm upwind from the antenna at a 30 second interval. Synthetic volatile stimuli were evaluated at the following doses: 10.0, 1.0, 0.1, 0.01, and 0.001 mg/mL while the 'Stanley' plum standard and DCM solvent were used as controls. A female plum curculio was exposed to each stimulus four times, yielding a 12 minute total trial time for each responder and a total of five females were evaluated for responses to extracts from each phenological collection interval.

Input signals were routed through 3-stage amplification yielding a measured output amplification of approximately 220x. Amplified signal was received by a USB-1608FS data acquisition unit (Measurement Computing Corporation, Norton, MA) and passed to a computer-based analytical program (DasyLab 9.0, Dasytec USA, Amherst, NH) for interpretation and recording of output. Output samples were taken and recorded at a rate of 31 samples per second and data were exported in spreadsheet form for analysis.

Statistics

EAG response data from each individual were then analyzed using the GLM procedure for mixed models. (SAS Institute 2009) to construct ANOVA tables for mean amplitude of response (mV) among all individuals evaluated. The EAG sensitivity model evaluated the effect of odor stimulus treatment with replicate used as a blocking factor. Dependent variable data were square-root transformed to stabilize variance. When the GLM indicated significant differences, multiple comparisons were calculated using Tukey's HSD ($P = 0.05$).

Trap tree experiments

Orchard set-up

Experimental blocks were established within six commercial apple orchards; Poverty Lane Orchards in Lebanon, NH, Apple Hill Orchard in Concord, NH, Gould Hill Orchard in Contoocook, NH, Scott Farm in Brattleboro, VT, Clarkdale Orchards, Deerfield, MA and Clark Brothers Orchard, Ashfield, MA. Each block was divided into two paired ~2.5 ha plots to compare trap tree and grower-standard treatment management strategies only. In the trap tree plot, 6-10 perimeter row trees were baited with volatile stimuli. All trees were unbaited in grower standard (control) plots (Table 2).

Standard volatile trap trees (2010)

Within all trap tree plots, the first trap tree was deployed ~25 m from the end of the row, and trap trees were separated by ~50 m within the row. Benzaldehyde dispensers consisted of 8 mL of a 9:1 neat solution of benzaldehyde: 1,2,4-trichlorobenzene formulated into 15 mL capped polyethylene vials (PGC Scientific Corp., Gaithersburg, MD). Each vial was suspended inside an inverted colored plastic drinking cup (volume = 266 mL) (Solo Cup Co., Urbana, IL) to minimize the potential negative impact of ultraviolet light on the stability of benzaldehyde. Based on release rate equations generated by Leskey and Zhang (2007), total release at 25°C would equal ~228 mg/day per trap tree. Pheromone dispensers contained 35 mg of grandisoic acid (ChemTica, San Jose Costa Rica); recent studies by Leskey and Zhang (2007) predicted that the

release rate was ~ 0.14 mg/day per trap tree at 25°C. The four benzaldehyde dispensers were deployed equidistantly throughout the outer third of the canopy and left for the entire season while the pheromone dispenser was deployed near the center of the tree (Prokopy *et al.*, 2003, 2004) and replaced after ~ 5 wk. Within control plots, unbaited control trees were established using the same spacing criteria (Table 2). Due to a serious frost destroying much of the crop, data was unable to be collected from Apple Hill and Poverty Lane Orchards.

Inclusion of trans-2-hexenal as an attractant (2011)

Based on EAG results (see Table 3), we evaluated the potential of trans-2-hexenal as an additional attractant for use in trap trees. In this case, within each trap tree plot, half of the trap trees received the standard volatile treatment used in 2010, while other was augmented with four trans-2-hexenal dispensers in addition to the standard attractants. Trans-2-hexenal dispensers consisted of 8 mL of neat material formulated into 15 mL capped polyethylene vials (PGC Scientific Corp., Gaithersburg, MD). Each vial was suspended inside an inverted colored plastic drinking cup (volume = 266 mL) (Solo Cup Co., Urbana, IL) as was done for benzaldehyde. Based on laboratory gravimetric studies conducted at 25°C, the release rate equal ~ 228 mg/day per trap tree. All other procedures were identical to standard practices.

Inclusion of trans-2-hexenal as a 'push' component (2012)

We evaluated the potential of trans-2-hexenal as a 'push' component in trap tree plots. In this case, within each trap tree plot, half of the trap tree plots received the standard

volatile treatment used in 2010, while others was augmented with four trans-2-hexenal dispensers in far-lateral trees in the perimeter row (Fig. 1). All other procedures were identical to standard practices.

Grandisoic acid release rate (2012)

We evaluated the potential of increasing the release rate of grandisoic acid in trap tree plots. In this case, half of the trap trees received pheromone dispensers containing 35 mg of grandisoic acid (ChemTica, San Jose Costa Rica); recent studies by Leskey and Zhang (2007) predicted that the release rate was ~ 0.14 mg/day per trap tree at 25°C. The other half received 5x that amount. All other procedures were identical to standard practices.

Deployment and evaluation

All trap tree and perimeter-row treatment plots were established during late bloom, ranging according to growing season from April 22 to May 8. At petal fall, each grower applied a full-block insecticide application (Table 2). After petal fall, plum curculio were managed in the trap tree plots using the trap tree management protocol and in control plots according to standards used by individual growers. In trap tree plots, only the trap trees were subsequently treated with insecticide following the full-block insecticide application at petal fall. Need for and timing of insecticide applications as well as material and rate used were determined by individual growers.

All experimental plots received a full block petal fall spray directed at plum curculio followed by trap tree treatments approximately 1-2 weeks later (Table 2). Fruit injury

evaluations were made after each risk period of additional PC injury passed each season based on the oviposition model for timing of insecticide sprays (Reissig *et al.*, 1998), ranging according to year from June 17-27. The total number of fruit with oviposition scars was recorded based on a sample of 20 fruits/tree in trap trees in the trap tree plots and control trees in grower standard plots, and in peripherally located trees surrounding each trap tree and control tree for a total of up to 2200 fruit per block (Fig. 1). In addition, 20 interior trees (20 fruits/tree) were sampled along diagonal paths from opposing corners of each plot to provide a measure of efficacy of each treatment regime to protect fruit from plum curculio immigration and injury. A total of 400 fruits per trap tree and perimeter row treated plots were sampled. These sampling schemes were used previously by Leskey *et al.* (2008) to evaluate fruit injury.

Statistics

Proportion fruit injury data were subject to an ARCSIN SQRT transformation. For standard volatile trials, models were constructed to compare % fruit injury in: 1) trap trees in experimental plots and unbaited control trees in grower standard plots; 2) trap trees and nearest neighbor lateral trees within trap tree plots (Fig. 1); 3) unbaited control trees in grower standard plots and nearest neighbor lateral trees within trap tree plots; and 4) interior trees within trap tree and grower standard plots as a measure of the effectiveness of the management strategies to protect fruit from plum curculio injury (these models did not include orchard as a class variable because trees were sampled on a per plot basis). When the GLM indicated significant differences in treatment or among orchard, multiple comparisons were calculated using Tukey's HSD at $\alpha = 0.05$.

Results

EAG studies.

When single host plant volatiles were presented at 10 mg/mL, significant differences were detected among treatments ($F=101.75$; $df=5, 110$; $P<0.001$) with trans-2-hexenal and 'Stanley' plum standard eliciting significantly greater responses compared with all other treatments. At 1 mg/mL for single host volatiles, significant differences were, again, detected ($F=59.84$; $df=5, 110$; $P<0.001$) with 'Stanley' plum standard eliciting the strongest response, and significantly greater than all other treatments except trans-2-hexenal (Table 3).

When single host volatiles were presented at 0.1 mg/mL ($F=239.81$; $df=5, 110$; $P<0.001$), 0.01 mg/mL ($F=132.80$; $df=5, 110$; $P<0.001$) and 0.001 mg/ mL ($F=97.69$; $df=5, 110$; $P<0.001$), significant differences were detected. Although 'Stanley' plum standard elicited the strongest response which was significantly greater than all treatments including trans-2-hexenal at these three concentrations, this single host plant volatile also elicited a strong response that was significantly greater than all other single host volatile treatments and the control (Table 3).

Trap tree treatments

Standard volatile trap trees (2010)

In comparisons of baited trap trees in experimental plots and unbaited control trees in grower standard plots, the model for fruit injury was significant ($F=11.43$; $df=4, 52$; $P<0.001$). The effect of treatment ($P<0.001$) and orchard ($P<0.001$) was significant. Significantly more injury was found within trap trees ($21.25\% \pm 5.14$ S.E.) in trap tree plots compared with unbaited control trees ($1.30\% \pm 1.01$ S.E.) in grower standard plots. Within individual orchards, injury in trap trees and unbaited control trees ranged from 4.09-56.15% and 0.00-4.38%, respectively (Table 2). The model for fruit injury within baited trap trees and laterally-located nearest neighbor trees within trap tree plots was significant ($F=25.38$; $df=4, 129$; $P<0.001$) and for unbaited control trees in grower standard plots and laterally-located nearest neighbor trees within trap tree plots ($F=10.75$; $df=7, 116$; $P<0.001$) with the effect of treatment ($P<0.001$) and orchard ($P<0.001$) being significant in both models. Within, trap tree plots, injury in laterally located trees ($9.53\% \pm 1.94$ S.E.) was significantly less than baited trap trees, but significantly greater compared with unbaited control trees in grower standard plots. In terms of interior protection, there was no significant difference between trap tree ($4.75\% \pm 0.71$ S.E.) and grower standard plots ($1.75\% \pm 3.5$ S.E.) based on fruit injury ($F=0.12$; $df=1, 6$; $P=0.73$).

Inclusion of trans-2-hexenal as an attractant (2011)

While injury in standard trap trees ($14.03\% \pm 2.82$ S.E.) was numerically greater than trap trees augmented with trans-2-hexenal ($8.75\% \pm 2.73$ S.E.), the model for fruit

injury was not significant ($F=0.06$; $df=6, 43$; $P=0.078$). Therefore, trap tree treatments were combined and compared with unbaited control trees in grower standard plots; the model for fruit injury was significant ($F=6.14$; $df=6, 83$; $P<0.001$) with the effect of treatment ($P<0.001$) and orchard ($P=0.029$) being significant. Injury in baited trap trees averaged $11.50\% \pm 1.98$ S.E. while injury in unbaited control trees from grower standard plots was significantly lower at $2.88\% \pm 1.04$ S.E. The model for fruit injury within baited trap trees and laterally-located nearest neighbor trees within trap tree plots was significant ($F=8.07$; $df=6, 189$; $P<0.001$) and for unbaited control trees in grower standard plots and laterally-located nearest neighbor trees within trap tree plots ($F=4.93$; $df=6, 179$; $P<0.001$) with the effect of treatment ($P<0.001$) and orchard ($P<0.001$) being significant in both models. Within, trap tree plots, injury in laterally located trees ($5.03\% \pm 0.67$ S.E.) was significantly less than baited trap trees, but significantly greater compared with unbaited control trees in grower standard plots. In terms of interior protection, there was no significant difference between trap tree ($0.80\% \pm 0.02$ S.E.) and grower standard plots ($1.50\% \pm 0.10$ S.E.) based on fruit injury ($F=0.11$; $df=1, 10$; $P=0.74$).

Inclusion of trans-2-hexenal as a 'push' component (2012).

Because there was no significant difference in the amount of injury present in trap trees with or without trans-2-hexenal deployed as a 'push' component in distant lateral trees, data from all trap tree plots were combined. As found previously, the model for fruit injury was significant ($F=7.39$; $df=3, 39$; $P<0.001$) with the effect of treatment ($P<0.001$) and orchard ($P=0.021$) being significant. Injury in trap trees ($10.05\% \pm 2.43$ S.E.) in trap tree plots was significantly greater than unbaited control trees in grower standard plots ($2.25\% \pm 1.42$ S.E.). The model for fruit injury within baited trap trees and laterally-located nearest neighbor trees within trap tree plots was significant

($F=7.60$; $df=3,176$; $P<0.001$) with the effect of treatment ($P<0.001$) and orchard ($P<0.001$) being significant. Within trap tree plots, injury in laterally located trees ($3.46\% \pm 1.01$ S.E.) was significantly less than baited trap trees. The model for injury comparing laterally located nearest neighbor trees in trap tree plots and unbaited control trees within grower standard plots was not significant ($F=1.67$; $df=3, 73$; $P=0.182$). In terms of interior protection, there was no significant difference between trap tree ($1.41\% \pm 0.92$ S.E.) and grower standard plots ($0.75\% \pm 0.50$ S.E.) based on fruit injury ($F=0.56$; $df=1, 4$; $P=0.50$).

Grandisoic acid release rate (2012)

While injury in trap trees with a five-fold increase in release rate of grandisoic acid ($6.97\% \pm 3.01$ S.E.) was numerically greater than standard trap trees ($2.31\% \pm 0.92$ S.E.), the model for fruit injury was not significant ($F=0.91$; $df=3, 20$; $P=0.455$). Therefore, trap tree treatments were combined and compared with unbaited control trees in grower standard plots; the model for fruit injury was not significant ($F=1.20$; $df=3, 35$; $P=0.3234$), though injury was numerically greater in trap trees in trap tree plots ($4.42\% \pm 1.57$ S.E.) than unbaited control trees in grower standard plots ($2.50\% \pm 1.29$ S.E.). The model for fruit injury within baited trap trees and laterally-located nearest neighbor trees within trap tree plots ($F=4.26$; $df=3,84$; $P=0.007$) and within control trees in grower standard plots and laterally-located nearest neighbor trees within trap tree plots ($F=8.46$ $df=3,77$; $P<0.001$) were significant with the effect of orchard ($P<0.001$) being significant, but not treatment. In terms of interior protection, there was no significant difference between trap tree ($2.08\% \pm 1.59$ S.E.) and grower standard plots ($3.75\% \pm 3.37$ S.E.) based on fruit injury ($F=0.07$; $df=1, 4$; $P=0.80$).

Discussion

While trans-2-hexenal, a common green leaf volatile, proved to be highly stimulating even at very low doses in the laboratory based on EAG responses (Table 3), we did not see evidence of increased attraction based on augmenting trap trees with this stimulus. Similarly, in original study aimed at developing baited trees as sentinels for monitoring plum curculio activity, Prokopy *et al.* (2003) reported that trans-2-hexenal did not increase activity within trap trees though the amount of material released per trap tree was reportedly ~five-fold lower. In studies with boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh., trans-2-hexenal did not synergize adult response to traps baited with their aggregation pheromone whereas other green leaf volatiles such as trans-2-hexen-1-ol did (Dickens *et al.*, 1990). Similarly, the chrysomelid strawberry leaf beetle, *Galerucella vittaticollis* Baly was not attracted to this compound, but was attracted to another green leaf volatile, cis-3-hexenyl in the field (Hori *et al.*, 2008). Indeed, results indicated that this green leaf volatile could be repellent to plum curculio based on numerically lower injury in trap trees augmented with this stimulus compared with standard trap trees (results reported here and also based on Prokopy *et al.*, 2003) and from previous laboratory studies demonstrating repellency at high concentrations (Leskey *et al.*, 2001).

Therefore, we attempted to increase overall aggregation within baited trap trees by using trans-2-hexenal as part of a push-pull strategy. Push-pull strategies are based on behavioral manipulation by making a protected resource unattractive to the pest (push component), but also luring them to attractive source (pull) where they can be removed or annihilated (Cook *et al.*, 2007). In this case, we used trans-2-hexenal deployed in lateral trees in trap tree plots as the 'push' component and the standard trap tree as the 'pull' component. However, we saw no increase in injury (and hence aggregation) in trap trees augmented by lateral trees baited with trans-2-hexenal. However, we were

able to only evaluate a single release rate of trans-2-hexenal in the field. We know from laboratory trials that dose or release rate is critical in terms of observing repellency (Leskey *et al.*, 2001). Therefore, increasing the overall amount of trans-2-hexenal deployed in lateral 'push' trees could improve overall aggregation within 'pull' trap trees. Indeed very few studies have explored using plant volatiles as repellents, only 3% based on a recent meta-analysis conducted by Szendrei and Rodriguez-Saona (2010). Thus, more effort toward development of behaviorally based management of agricultural pests is needed. Moreover, trans-2-hexenal appears to be a reliable and sensitive chemical standard for evaluating amplitude of EAG responses from plum curculio relative to other host plant volatiles and host plant extracts which could prove useful in identifying other potential attractants and repellents.

We also attempted to improve the efficacy of trap trees by increasing the amount of grandisoic acid released per trap tree. Interestingly, we saw no increase in aggregation within trap trees based on comparisons of trap trees with and without 5x higher grandisoic acid release rates. Moreover, we saw no significant difference in the amount of injury trap trees and laterally located nearest neighbor trees indicating a potential decrease in overall aggregation in trap trees. Similarly, Prokopy *et al.* (2004) evaluated increasing the amount of grandisoic acid by 2x to improve trap trees for monitoring purposes and observed no increase in overall activity within baited trap trees. Perhaps, the higher release rate of grandisoic acid actually increased the active space of the pheromone leading to increased activity in nearest neighbor trees as well, thereby reducing the overall efficacy of the approach. The function of aggregation pheromones can include efficient resource use, mate-finding and protection from natural enemies and from environmental conditions (Wertheim *et al.*, 2005). Certainly, both male and female plum curculios respond to grandisoic acid (Eller and Bartelt, 1996), to host plant odors (Leskey *et al.*, 2001; Leskey and Prokopy, 2001) and to combinations of these stimuli in traps (Piñero and Prokopy, 2003; Leskey *et al.*, 2005; Akotsen-Mensah *et*

al., 2010). However, it seems that establishing the active space of a particular combination and release rate within the context of an orchard will be necessary to better deploy these stimuli to improve overall efficacy of trap trees.

Another mechanism that could improve overall efficacy of this 'attract and kill' approach could be based on the insecticide selections made by growers to treat baited trap trees. Most growers typically have treated trap trees with either Avaunt (indoxacarb), Assail (acetimiprid) or Imidan (phosmet) (Leskey *et al.*, 2008). However, dried insecticide residues of these three insecticides had relatively minor effects on mobility and mortality of plum curculio following a 2 h exposure interval in a recent laboratory study. Interestingly, a pyrethroid, Asana (esenvaterate) produced the most immediate effects on mobility and a high degree of mortality (Leskey *et al.*, 2012). Within orchards, it seems likely that adults who contact Asana residues while foraging within treated canopies would succumb very quickly. And although pyrethroids have long been considered effective against plum curculio they also are considered problematic because of their tendency to flare populations of phytophagous mite pests such as the European red mite, *Panonychus ulmi* (Koch), and two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Koch) due to toxicity to predaceous mites and other natural enemies. However, a pyrethroid may be a good fit if used as part of a targeted and spatially limited management technique such as the trap tree management strategy,

Other factors may be important, however, in terms of material selection. Curative activity of particular insecticides including azinphosmethyl, phosmet, thiamethoxam, aceptamiprid and thiacloprid have been documented. Treating tart cherries infested with plum curculio with these compounds resulted in substantial reductions in emerging larvae (Hoffmann *et al.*, 2009). Thus, by treating baited trap trees with materials that have curative properties could reduce overall infestations in fruit leading to decreases in larvae generated by this 'attract and kill' approach. Another method to

reduce overall larval infestations generated by infested fruit is to apply entomopathogenic nematodes to the soil to control emerging larvae from fruit (Shapiro-Ilan *et al.*, 2004, 2008). In this case, one could limit the amount of material needed and apply them simply to the soil beneath baited trap trees only. Shapiro-Ilan *et al.* (2011) identified strains of entomopathogenic nematodes effective against the northern strain of plum curculio including *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Nematoda: Steinernematidae), *S. rarum* (Doucet, 1986) (Nematoda: Steinernematidae) and *S. riobrave* (Cabanillas, Poinar and Raulston, 1994) (Rhabditida: Steinernematidae). These entomopathogenic nematodes could be used to control larvae generated in baited trap trees to reduce overall populations of plum curculio in and near orchards resulting in a multi lifestage approach to plum curculio management in apple orchards.

Acknowledgments

We thank Torri Hancock, John Cullum and Sean Wiles for excellent technical assistance. This work was supported in part by grant # 2009-51181-06005 from USDA-NIFA Specialty Crops Research Initiative. Mention of trade names or commercial products in this publication is solely for the purpose of providing specific information and does not imply recommendation or endorsement by the U.S. Department of Agriculture.

Bibliography

- AKOTSEN-MENSAH, C., R. BOOZER et H.Y. FADAMIRO (2010). Field evaluation of traps and lures for monitoring plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in Alabama Peaches. *J. Econ. Entomol.* 103(3): 744-753.
- ALM, S.R., et F.R. HALL (1986). Antennal sensory structures of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79: 324-333.
- AMIS, A., et J.J. SNOW (1985). « *Conotrachelus nenuphar* ». P. Singh et R. F. Moore, (éds.), *Handbook of Insect Rearing*, Vol. 1. New York, Elsevier Science Publishing, p. 227-236.
- ANONYMOUS (2009). *Spray Bulletin for Commercial Tree Fruit Growers. Virginia, West Virginia and Maryland*. Cooperative Extension Publication 456-419.
- BOEVÉ, J. L., U. LENGWILER, L. TALLSTEN, S. DORN et T.J.T. TURLINGS (1996). Volatiles emitted by apple fruitlets infested by larvae of the European apple sawfly. *Phytochem.* 42: 373-381.
- BROWN, M.W. (2005). Host utilization and phenology of injury by plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in West Virginia. *J. Entomol. Sci.* 40: 149-157.
- BUCHBAUER, G., L. JIROVETZ, M. WASICKY et A. NIKFOROV (1993). Headspace and essential oil analysis of apple flowers. *J. Agric. Food. Chem.* 41: 116-118.
- BUTKEWICH, S.L., et R.J. PROKOPY (1993). The effect of short-range host odor stimuli on host fruit finding and feeding behavior of plum curculio adults. *J. Chem. Ecol.* 19: 825-835.
- COOK, S.M, Z.R. KHAN et J.A. PICKETT (2007). The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Ann. Rev. Entomol.* 52: 375-400.
- DICKENS, J.C., E.B. JANG, D.M. LIGHT et A.R. ALFORD (1990). Enhancement of insect pheromone responses by green leaf volatiles. *Naturwissenschaften.* 77(1): 1-49.
- ELLER, F.J., et R.J. BARTELT (1996). Grandisoic acid a male produced aggregation pheromone from the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*. *J. Nat. Prod.* 59: 451-453.

- HOFFMANN, E J., C. VANDERVOORT et J.C. WISE (2009). Curative activity of insecticides against plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in tart cherries. *J. Econom. Entomol.* 102: 1864-1873.
- HORI, M., K. OHUCHI et K. MATSUDA (2008). Role of host plant volatile in the host-finding behaviour of the strawberry leaf beetle, *Galerucella vittaticollis* Baly (Coleoptera: Chrysomelidae). *Appl. Entomol. Zoo.* 41: 357-363.
- KOEHLER, G.W. (2003). *New England apple pest management network* (<http://www.pronewengland.org>).
- LAFLEUR G., et S.B. HILL (1987). Spring migration, within-orchard dispersal, and apple-tree preference of the plum curculio in Southern Quebec. *J. Econ. Entomol.* 80: 1173-1187.
- LANDOLT, P.J. (1997). Sex attractant and aggregation pheromones of male phytophagous insects. *Am. Entomol.* 43: 12-21.
- LANDOLT, P.J., et T.W. PHILLIPS (1997). Host plant influences on sex pheromone behaviour of phytophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 371-391
- LESKEY, T.C., et R.J. PROKOPY (2001). Adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) attraction to fruit and conspecific odors. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 275-288.
- LESKEY, T.C., et S. WRIGHT (2004a). Monitoring plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae), population in apple and peach orchards in the Mid-Atlantic. *J. Econ. Entomol.* 97(1): 79-88.
- LESKEY, T.C., et S. WRIGHT (2004b). Influence of host tree proximity on adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) responses to monitoring traps. *Environ. Entomol.* 33: 389-396.
- LESKEY, T.C. et A. ZHANG (2007). Impact of temperature on plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) responses to odor-baited traps. *J. Econ. Entomol.* 100: 343-349.
- LESKEY, T.C., R.J. PROKOPY, S. WRIGHT, P.L. PHELAN et L. W. HAYNES (2001). Evaluation of individual components of plum odor as potential attractants for adult plum curculios. *J. Chem. Ecol.* 27(1): 1-17.

- LESKEY, T.C., A.J. ZHANG et M. HERZOG (2005). Nonfruiting host tree volatile blends: Novel attractants for the plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 34(4): 785-793.
- LESKEY, T.C., J.C. PIÑERO et R.J. PROKOPY (2008). Odor baited trap trees: novel management tool for the plum curculio. *J. Econ. Entomol.* 101: 1302-1309.
- LESKEY, T.C., G. CHOUINARD et C. VINCENT (2009a). « Monitoring and management of the apple maggot fly and the plum curculio: honoring the legacy of R. J. Prokopy », M. Aluja, T.C. Leskey, C. Vincent (éds.), *Biorational Tree Fruit Pest Management*. Wallingford, Oxon, UK: CABI Publishing, p. 110-144.
- LESKEY, T.C., S. WRIGHT, W. ANGER, G. CHOUINARD, D. CORMIER, A. PICHETTE et A. ZHANG (2009b). Electroantennogram technique for *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 38(3): 870-878.
- LESKEY, T.C., S. WRIGHT, J. SAGUEZ et C. VINCENT (2012). Impact of insecticide and fungicide residue contact on plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst), mobility and mortality: implications for pest management. *Pest Manag. Sci.* 69(4): 464-70.
- PIÑERO, J., et R.J. PROKOPY (2003). Field evaluation of plant odour and pheromonal combinations for attracting plum curculios. *J. Chem. Ecol.* 29: 2735-2748.
- PIÑERO, J.C., S. WRIGHT et R.J. PROKOPY (2001). Response of plum Curculio (Coleoptera: Curculionidae) to odor-baited traps near woods. *J. Econ. Entomol.* 94(6): 1386-1397.
- PIÑERO, J.C., A.M. AGNELLO, A. TUTTLE, T.C. LESKEY, H. FAUBERT, G. KOEHLER, L. LOS, G. MORIN, K. LEAHY, D.R. COOLEY et R.J. PROKOPY (2011). Effectiveness of odor-baited trap trees for plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) monitoring in commercial apple orchards in the Northeast. *J. Econ. Entomol.* 104: 1613-1621.
- PROKOPY, R.J. (2003). Two decades of bottom-up, ecologically based pest management in a small commercial orchard in Massachusetts. *Agri., Ecosyst. Environ.* 94: 299-309.

- PROKOPY, R.J., P.L. PHELAN, S. WRIGHT, A.J. MINALGA, R. BARGER et T. LESKEY (2001). Compounds from host odor attractive to plum curculio adults (Coleoptera: Curculionidae). *J. Entomol. Sci.* 36(2): 122-134.
- PROKOPY, R.J., B.W. CHANDLER, S.A. DYNOK et J. PIÑERO (2003). Odor-baited trees: a new approach to monitoring plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 96: 826-834.
- PROKOPY, R.J., I. JACOME, E. GRAY, G. TRUJILLO, M. RICCI et J.C. PIÑERO (2004). Using odor-baited trap trees as sentinels to monitor plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in apple orchards. *J. Econ. Entomol.* 97: 511-517.
- REISSIG, W.H., J.P. NYROP et R. STRAUB (1998). Oviposition model for timing insecticide sprays against plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in New York State. *Environ. Entomol.* 27: 1053-1061.
- SAS. (2003). *SAS Software: Version 8.2*. SAS Institute, Cary, NC.
- SHAPIRO-ILAN, D.I., R.F. III MIZELL, T.E. COTTRELL et D.L. HORTON (2004). Measuring field efficacy of *Steinernema feltiae* and *Steinernema riobrave* for suppression of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* larvae. *Biol. Cont.* 30: 496-503.
- SHAPIRO-ILAN, D.I., R.F. III MIZELL, T.E. COTTRELL et D.L. HORTON (2008). Control of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, with entomopathogenic nematodes: Effects of application timing, alternate host plant, and nematode strain. *Biol. Cont.* 44: 207-215.
- SHAPIRO-ILAN, D.I., T.C. LESKEY, et S. WRIGHT (2011). Virulence of entomopathogenic nematodes to plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*: Effects of strain, temperature, and soil type. *J. Nematol.* 43 (3-4): 187-195.
- SMITH, E.H., et J.K. FLESSEL (1968). Hibernation of the plum curculio and its spring migration to host trees. *J. Econ. Entomol.* 61(1): 193-203.
- SZENDREI, Z, et C. RODRIGUEZ-SAONA (2010). A meta-analysis of insect pest behavioral manipulation with plant volatiles. *Entomol. Exper. App.* 134: 201-210.
- THOMPSON, J.R. (1932). Sex differentiation of adults of *Conotrachelus nenuphar*. *J. Econ. Entomol.* 25: 807-810.
- VINCENT, C., G. CHOUINARD et S.B. HILL (1999). Progress in plum curculio management: a review. *Agric. Ecos. Environ.* 73: 167-175.

- VINCENT, C., G. CHOUINARD et T. LESKEY (2004). « The Plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* Herbst (Coleoptera: Curculionidae) » L. Capinera (éds.) *Encyclopedia of Entomology*, Vol. 3, Dordrecht, The Netherlands, Kluwer. p. 1769-1774.
- WERTHEIM, B., E-J.A. VAN BAALEN, M. DICKE et L.E.M. VET (2005). Pheromone-mediated aggregation in nonsocial arthropods: An evolutionary ecological perspective. *Annu. Rev. Entomol.* 50:321-46.
- ZHANG, A., et S. POLAVARAPU (2003). Sex Pheromone of the cranberry blossom worm, *Epiglaea apiata*. *J. Chem. Ecol.* 29: 2153-2164.
- ZHANG, A., C. LINN, S. WRIGHT, R. PROKOPY, W. REISSIG et W. ROELOFS (1999). Identification of a new blend of apple volatiles attractive to the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*. *J. Chem. Ecol.* 25: 1221-1232.

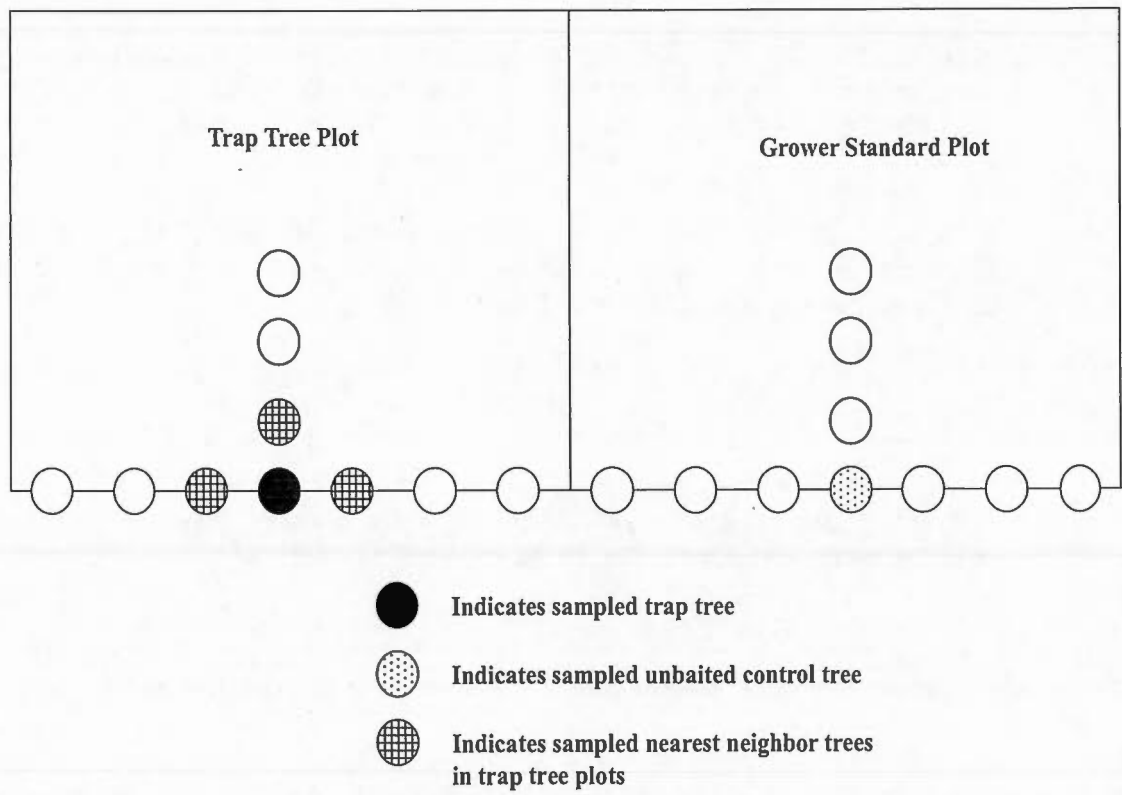


Fig. 1 Trap tree and grower standard plots.

Table 1 Behavioral responses of plum curculio to olfactory stimuli in still-air two-way bioassays

Compound	Source	Laboratory Responses	Field Responses
Ethyl acetate	'Fellenberg' plums	NA ¹	NA ¹
Ethyl butyrate	'Fellenberg' plums	NA ¹	NA ¹
(R)-(+)-Limonene	'Fellenberg' plums, 'Stanley' foliar and woody tissues	A ²	A, AB ²
Trans-2-hexenal	'Fellenberg' plums	R ³	NA ³

Bioassays in the laboratory (Leskey *et al.*, 2001), semi-field bioassays using baited boll weevil traps (Leskey *et al.*, 2001) or baited pyramid traps (Leskey *et al.*, 2005) to synthetic volatiles released by *P. domestica* cultivars "Fellenberg" and "Stanley"; A (Attractive), AB (Attractive when presented as part of a blend in combination with grandisoic acid), NA (not attractive), R (repellent).

¹ Not attractive in the laboratory or field.

² Attractive at 0.01% concentration in the laboratory, 5.00% in the field, and as part of a blend in the field.

³ Repellent at 1.00, 0.10, and 0.01% concentrations in the laboratory, not attractive at 5.00% in the field.

Table 2 Commercial orchard characteristics in experimental trap tree and grower standard plots

Orchard	Location	Experimental Plot Size (ha)	Trap trees (N)	Grower Standard Plot Size (ha)	Control Trees (N)
Poverty Lane	Lebanon, NH	1.26	7	1.32	6
Gould Hill	Contoocook, NH	1.52	11	0.62	4
Apple Hill	Concord, NH	2.82	8	2.41	5
Scott Farm	Dummerston, VT	2.04	8	1.81	8
Clarkdale	Deerfield, MA	1.06	8	0.98	7
Clark Brothers	Ashfield, MA	2.07	8	1.57	7

Table 3 Mean (\pm S.E.) electroantennogram response obtained from adult plum curculios from each synthetic odor treatment evaluated

Odor Treatment	10 mg/mL	1 mg/mL	0.1 mg/mL	0.01 mg/mL	0.001 mg/mL
Control	27.3 \pm 3.9 d ¹	48.3 \pm 5.7 e	62.0 \pm 5.4 e	65.1 \pm 4.5 d	58.7 \pm 6.2 d
Ethyl acetate	82.6 \pm 4.9 c	76.9 \pm 7.2 d	65.8 \pm 6.0 e	67.7 \pm 5.7 d	79.7 \pm 6.0 c
Ethyl butyrate	187.0 \pm 12.9 b	177.9 \pm 23.3 bc	138.3 \pm 10.7 c	119.0 \pm 6.5 c	83.2 \pm 7.2 c
(R)-(+)-Limonene	160.1 \pm 11.1 b	132.4 \pm 14.5 c	91.2 \pm 14.2 d	121.5 \pm 6.3 c	90.0 \pm 6.5 c
'Stanley' plum	251.9 \pm 19.6 a	267.5 \pm 24.6 a	324.0 \pm 16.7 a	300.9 \pm 15.6 a	249.9 \pm 14.5 a
Trans-2-hexenal	260.4 \pm 9.7 a	216.7 \pm 12.0 ab	171.5 \pm 15.3 b	227.1 \pm 7.7 b	163.6 \pm 12.7 b

Odours evaluated at five concentrations, 'Stanley' plum standard and dichloromethane control also evaluated.

¹ Different letters in the same column indicate significant differences according to Tukey's HSD ($P < 0.05$).

BIBLIOGRAPHIE

- ADDESSO, K.M., et H.J. MCAUSLANE (2009). Pepper Weevil attraction to volatiles from host and nonhost plants. *Environ. Entomol.* 38: 216-224.
- AGRICULTURE AND AGRI-FOOD CANADA (2013). National Strategy to Reduce the Risks from the use of Organophosphate Pesticides in Pome Fruit Orchards. Récupéré le 1 novembre 2014 de <http://www.agr.gc.ca/eng/?id=1362096152296>
- AGRICULTURE AND AGRI-FOOD CANADA (2014). Reduced-Risk Strategy for Apple Scab Management. Récupéré le 10 octobre 2014 de http://www5.agr.gc.ca/resources/prod/doc/pmc/pdf/apple_scab_strategie_tavelure_du_pommier-eng.pdf
- AKOTSEN-MENSAH, C. (2010). *Ecology and management of plum curculio, Conotrachelus nenuphar (Coleoptera: Curculionidae) in Alabama Peaches*. Mémoire de Doctorat. Auburn University, Alabama, USA. 180 p.
- AL-DEEB, M.A, S.B. MUZAFFAR et E.M. SHARIF (2012). Interactions between phoretic mites and the Arabian rhinoceros beetle, *Oryctes agamemnon arabicus*. *J. Insect Sci.* 12: 128.
- ALM, S. R., et F.R. HALL (1986). Antennal sensory structures of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79: 324-333.
- ALSTON, D.G., et A.V. STARK (2000). *Plum curculio biology and distribution in Utah*. Proc. Utah State Hort. Assn. Provo, UT. (<http://www.utahhort.org/talks/2000/alston.htm>)
- AMIS, A., et J.J. SNOW (1985). « *Conotrachelus nenuphar* ». P. Singh et R.F. Moore, (éds.), *Handbook of Insect Rearing*, Vol. 1. New York, Elsevier Science Publishing, p. 227-236.
- ARMSTRONG, T. (1958). Life-history and ecology of the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst.) (Coleoptera: Curculionidae), in the Niagara Peninsula, Ontario. *Can. Entomol.* 90: 8-17.
- ASPI, J., et A.A. HOFFMAN (1998). Female encounter rates and fighting costs of males are associated with lek size in *Drosophila mycetophaga*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 42:163-169.

- BECKAGE, N.E. (2005). Physiological and behavioral host-parasitoid interactions: Future Visions. *Arch. Insect Bioch. Physiol.* 60:151–152.
- BÉLAIR, G., C. VINCENT et G. CHOUINARD (1998). Foliar sprays with *Steinernema carpocapsae* against early-season apple pests. *J. of Nematology*. 30(4S): 599–606.
- BESSIN, R. (2013). Controlling apple insect pests. Récupéré le 20 novembre 2014 de <http://www2.ca.uky.edu/entomology/entfacts/ef201.asp>
- BERESFORD, D.V., et J.F. SUTCLIFFE (2010). Assessing pest control using changes in instantaneous rate of population increase: treated targets and stable fly populations case study. *J. Dairy Sci.* 93: 2517–2524.
- BOBB, M. L. (1949). Hibernation of the plum curculio in Virginia. *J. Econ. Entomol.* 42: 19–22.
- BOBB, M.L. (1952). The life history and control of the plum curculio in Virginia. *Bull. W.V. Univ. Agri. Exper. Stat.* No. 453, 30 p.
- BOEVÉ, J.L., U. LENGWILER, L. TALLSTEN, S. DORN et T.J.T. TURLINGS. (1996). Volatiles emitted by apple fruitlets infested by larvae of the European apple sawfly. *Phytochem.* 42: 373–381.
- BOLU, H. (2006). A New Host [*Tatianaerhynchites aequatus* (L.) Coleoptera: Rhynchitidae] Record for *Bracon pectoralis* Wesmael, *Baryscapus bruchidii* (Erdös), *Eupelmus urozonus* Dalman and *Exopristus trigonomerus* (Masi) from Turkey. *J. Ent. Res. Soc.* 8(3): 51–62.
- BOUGHTON, A., et H.Y. FADAMIRO (1996). Effect of age and sex on the response of walking *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) to its male-produced aggregation pheromone. *J. Stored Prod. Res.* 32(1): 13–20.
- BRENNAN, B.M., F. CHANG et W.C. MITCHELL (1977). Physiological effects on sex pheromone communication in the southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Environ. Entomol.* 6: 169–173.
- BROERSMA, D.B., et S.B. HAYS. (1966). Improved methods for mass rearing plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*. *J. Econ. Entomol.* 59(1): 235–236.
- BUCHBAUER, G., L. JIROVETZ, M. WASICKY et A. NIKFOROV (1993). Headspace and essential oil analysis of apple flowers. *J. Agric. Food. Chem.* 41: 116–118.

- BUTKEWICH, S.L., et R.J. PROKOPY (1993). The effect of short-range host odor stimuli on host fruit finding and feeding behavior of plum curculio adults. *J. Chem. Ecol.* 19: 825-835.
- BUTKEWICH, S.L., et R.J. PROKOPY (1997). Attraction of adult plum curculios to host-tree odor and visual stimuli in the field. *J. Entomol. Sci.* 32: 1-6.
- BUTKEWICH, S.L., R.J. PROKOPY et T.A. GREEN (1987). Discrimination of occupied host fruit by plum curculio females (Coleoptera: Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* 13(8): 1833-1841.
- CALKINS, C.O., M. D. HUETTEL et M. MCKOY (1976). Spatial and temporal distribution of oviposition by plum curculios. *Fla. Entomol.* 59: 205-209.
- CHAGNON, M., et A. PAYETTE (1990). *Modes alternatifs de répression des insectes dans les agrosystèmes québécois*. Québec, Ministère de l'environnement et centre québécois de valorisation de la biomasse, 447 p.
- CHAPMAN, P.J. (1938). *The plum curculio as an apple pest*. New York State Agric. Expt. Stn. 684, Geneva, New York, 73 p.
- CHOUINARD, G., S.B. HILL, C. VINCENT et N.N. BARTHAKUR (1992a). Border-row sprays for control the plum curculio in apple orchards: behavioural study. *J. Econ. Entomol.* 85: 1307-1317.
- CHOUINARD, G., V. CHARLES, S.B. HILL et P. BERNARD (1992b) Cyclic behavior of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae), within caged dwarf apple trees in spring. *J. Insect Behav.* 5(3): 385-394.
- CHOUINARD G., S.B. HILL et C. VINCENT (1993). Spring behavior of the plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) within caged dwarf apple trees. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 86: 333-340.
- CHOUINARD, G., S.B. HILL et C. VINCENT (1994). Spatial distribution and movements of plum curculio adults within caged apple trees. *Entomol. Exper. App.* 70: 129-142.
- CHOUINARD, G., Y. MORIN et R. CHARBONNEAU (1998). *Guide des traitements foliaires du pommier*. Québec, Conseil des productions végétales du Québec Inc.

- CHOUINARD, G., Y. MORIN et C. BRODEUR (2001). « Lutte contre les insectes et acariens », G. Chouinard (éd.), *Guide de gestion intégrée des ennemis du pommier*. Sainte-Foy, Québec. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec. p. 101-138.
- CHOUINARD, G., D. CORMIER et V. PHILION (2013). Affiche grand format, Québec, IRDA, Fédération des producteurs de pommes du Québec, CRAAQ et MAPAQ. *Production fruitière intégrée 2013-14*. 1 p.
- CLARK, J.M. (2010) A new histiostomid mite (Acari: Astigmatina: histiostomatidae) from blue penguin burrows. *New Zeal. Nat. Sci.* 35: 9-16.
- COFFELT, J.A., et W.E. BURKHOLDER (1972). Reproductive biology of the cigarette beetle *Lasioderma serricorne*. 1. Quantitative laboratory bioassay of the female sex pheromone from females of different ages. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 65: 447-450.
- COOK, S.M, Z.R. KHAN et J.A. PICKETT (2007). The use of push-pull strategies in Integrated Pest Management. *Ann. Rev. Entomol.* 52: 375-400.
- COOMBS, A. (2001). *Trap designs and attractants for monitoring plum curculio, Conotrachelus nenuphar (Herbst)*. Mémoire de maîtrise en biology, East Lansing, MI, Michigan State University, 214 p.
- DICKENS, J.C. (1986). Orientation of boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae) to pheromone and volatile host compound in the laboratory. *J. Chem. Ecol.* 12: 91-98.
- DIXON, J.C., et E.A. OSGOOD JR. (1961). Southern pine beetle. A review of present knowledge. *U.S. Dept. Agr., Forest Serv., Southeast. Exp. Sta. Paper.* 128: 1-34.
- DIXON, B.M., R.J. PROKOPY et B.B. SCHULTZ (1999). Influence of weather and time of day on plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) tree canopy entry behaviors and evaluation of traps for predicting fruit injury. *J. Entomol. Sci.* 34: 191-202.
- ELLER, F.J., et R.J. BARTELT (1996). Grandisoic acid a male produced aggregation pheromone from the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*. *J. Nat. Prod.* 59: 451-453.
- ELLER, F.J., R.J. BARTELT, B.S. SHASHA, D.J. SCHUSTER, D.G. RILEY, P.A. STANSLY, T.F. MUELLER, K.D. SHULER, B. JOHNSON, J.H. DAVIS et C.A. SUTHERLAND (1994). Aggregation pheromone for the pepper weevil,

- Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): identification and field activity. *J. Chem. Ecol.* 20(7): 1537-1555.
- ELZINGA, R.J., et A.B. BROCE (1988). *Hypopi* (Acari: Histiostomatidae) on house flies (Diptera: Muscidae): a case of detrimental phoresy. *J. Kan. Entomol. Soc.* 61:208-213.
- FÉDÉRATION DES PRODUCTEURS DE POMME (2008). *Assemblée Générale Annuelle, Le Parcours du Cerf*, Longueuil, Québec. p. 115.
- FLETCHER, L.W., H.V. CLABORN, J.P. TURNER et E. LOPEZ (1968). Difference in response of two strains of screw-worm flies to the male pheromone. *J. Econ. Entomol.* 61(5): 1386-1388.
- FLINT, H.M., et C.C. DOANE (2013). Understanding Semiochemicals with Emphasis on Insect Sex Pheromones in Integrated Pest Management Programs. Radcliffe's IPM World Textbook. University of Minnesota, MN. (<http://ipmworld.umn.edu/chapters/flint.htm>)
- GARMAN, P., et M.P. ZAPPE (1929). Control studies on the plum curculio in Connecticut apple orchards. *Conn. Agri. Stat. Bull.* 301: 373-437.
- HAGLEY, E.A.C, L.G. MONTEITH, D.H.C. HERNE et R. TROTTIER (1977). Pest population buildup in apple orchards following omission of insecticide and acaricide sprays. *Proc. Entomol. Soc. Ont.* 108: 7-11.
- HALLETT, R.H., A.C. OEHLISCHLAGER et J.B. BORDEN (1999). Pheromone trapping protocols for the Asian palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Intern. J. Pest Manag.* 45: 231-237.
- HALLMAN, G.J., et W.P. GOULD (2004). Evaluation of subtropical and tropical fruits as potential hosts for the southern strain plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *Fla. Entomol.* 87: 241-243.
- HARDEE, D.D., G.H. MCKIBBEN, D.R. RUMMEL, P.M. HUDDLESTON et J.R. COPPEDGE (1974). Response of boll weevils to component ratios and doses of the pheromone, grandlure. *Environ. Entomol.* 3: 135-138.
- HEDIN, P.A., D.A. DOLLAR, J.K. COLLINS, J.G. DUBOIS, P.G. MULDER, G.H. HEDIN, M.W. SIMTH et R.D. EUCRENBARY (1997). Identification on of male pecan weevil pheromone. *J. Chem. Ecol.* 23: 965-977.

- HODGES, R.J., L.A. BIRKINSHAW, D.I. FARMAN et D.R. HALL (2002). Intermale variation in aggregation pheromone release in *Prostephanus truncatus*. *J. Chem. Ecol.* 28(8): 1665-1674.
- HÖLGUND, J., et R. ALATALO (1995). *Leks*. New Jersey, Princeton University, 224p.
- HORTON, D., et D. JOHNSON (2005). « Southeastern Peach Grower's Handbook ». D. Horton et D. Johnson (eds.). *Georgia Extension Handbook*, No. 1. Georgia, University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences, 312 p.
- HOUCK M.A., et A.C. COHEN (1995). The potential role of phoresy in the evolution of parasitism. Radiolabeling (tritium) evidence from an astigmatid mite. *Exper. App. Acarol.* 19:677-694.
- HOUCK M.A., et B.M. OCONNOR (1991). Ecological and evolutionary significance of phoresy in the *Astigmata*. *Ann. Rev. Entomol.* 36:611-636.
- HOYT, S.C., J.R. LEEPER, G.C. BROWN et B.A. CROFT (1983). « Basic biology and management components for insect IPM » B.A. Croft and S.C. Hoyt (eds.). *Integrated management of insect pests of pome and stone fruits*. New York, Wiley, p. 93-151.
- INNOCENZI, P.J., D.R. HALL et J.V. CROSS (2001). Components of male aggregation pheromone of strawberry blossom weevil, *Anthonomus rubi* Herbst. (Coleoptera: Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* 27(6): 203-1218.
- INSTITUT DE LA STATISTIQUE DU QUÉBEC (2008). *Données statistiques, industrie alimentaire, culture, pomme*. Web Institut de la statistique du Québec, (http://www.stat.gouv.qc.ca/donstat/econm_finnc/filr_bioal/culture/pomme/AK110068.htm consulté le 15 Février, 2009)
- JENKINS, D., T. COTTRELL, D. HORTON, A. HODGES et G. HODGES (2006). Hosts of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae), in central Georgia. *Environ. Entomol.* 35: 48-55.
- JOHNSON, A.W., et S.B. HAYS (1969). Laboratory mating behaviour of the plum curculio. *J. Econ. Entomol.* 62(2): 438-440.
- JOHNSON, D.T., Jr, P.G. MULDER, B.D. MCCRAW, B.A. LEWIS, B. JERVIS, B. CARROLL et P.J. MCCLEOD (2002). Trapping plum curculio *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) in the southern United States. *Environ. Entomol.* 31: 1259-1267.

- KEESEY, I.W., et B.A. BARRETT (2012). Behavioral and electroantennographic responses of the lesser chestnut weevil, *Curculio sayi* (Coleoptera: Curculionidae), to odors emanating from different chestnut plant tissues. *J. Kan. Entomol. Soc.* 85(2):145-154.
- KEITT, T., M. LEWIS et R. HOLT (2001). Allee effects, invasion pinning, and species' borders. *Amer. Natur.* 157: 203–216.
- KIM, H.G., et D.G. ALSTON (2008). Potential of two entomopathogenic nematodes for suppression of plum curculio (*Conotrachelus nenuphar*, Coleoptera: Curculionidae) life stages in northern climates. *Environ. Entomol.* 37: 1272-1279.
- KOAN, J. (2007). Project Update! Integrating organic pig and apple production. *Newsletter of the Upper Midwest Organic Tree Fruit Growers, Network.* 3:10.
- LAFLEUR, G., et S.B. HILL (1987). Spring migration, within-orchard dispersal, and apple-tree preference of the plum curculio in Southern Quebec. *J. Econ. Entomol.* 80: 1173-1187.
- LAFLEUR, G., S.B. HILL et C. VINCENT (1987). Fall migration, hibernation site selection, and associated winter mortality of plum curculio (Coleoptera Curculionidae) in southern Quebec. *J. Econ. Entomol.* 80: 1152-1172.
- LAMOTHE, S., G. CHOUINARD et C. VINCENT (2008). Abiotic factors and trap design modulate the performance of traps used to monitor the plum curculio. *J. Econ. Entomol.* 101(6): 1838-1846.
- LAN, Z., H. SCHERM et D.L. HORTON (2004). Temperature-dependent development and prediction of emergence of the summer generation of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in the southeastern United States. *Environ. Entomol.* 33: 174–181.
- LANDOLT, P.J. (1997). Sex attractant and aggregation pheromones of male phytophagous insects. *Am. Entomol.* 43: 12-21.
- LANDOLT, P.J., et T.W. PHILLIPS (1997). Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 371-391.
- LATHROP, F.H. (1949). Biology of the plum curculio in Maine. *J. Econ. Entomol.* 42: 12-18.

- LE BLANC, J.P.R., S.B. HILL et R.O. PARADIS (1984). Oviposition in scout-apples by plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae), and its relationship to subsequent damage. *Environ. Entomol.* 13: 286-291.
- LESKEY, T.C., et R.J. PROKOPY (2000). Sources of apple odor attractive to adult plum curculios. *J. Chem. Ecol.* 26(3): 639-653.
- LESKEY, T.C., et R.J. PROKOPY (2001). Adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) attraction to fruit and conspecific odors. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 275-288.
- LESKEY, T.C., et R.J. PROKOPY (2002). A branch-mimicking trap for capturing adult plum curculios (Coleoptera: Curculionidae). *Entomol. Exp. Appl.* 102: 253-259.
- LESKEY, T.C., et S. WRIGHT (2004a). Monitoring plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae), population in apple and peach orchards in the Mid-Atlantic. *J. Econ. Entomol.* 97(1): 79-88.
- LESKEY, T.C., et S. WRIGHT (2004b). Influence of host tree proximity on adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) responses to monitoring traps. *Environ. Entomol.* 33(2): 389-396.
- LESKEY, T.C., et S. WRIGHT (2007). Host preference of the plum curculio. *Entomol. Exp. Appl.* 123: 217-227.
- LESKEY, T.C., C. BRAMLAGE, L. PHELAN et R.J. PROKOPY (1996). Attraction of plum curculio adults to host-plant and pheromonal extracts. *Fruit Notes.* 61(1): 7-9.
- LESKEY, T.C., R.J. PROKOPY, S. WRIGHT, P.L. PHELAN et L. W. HAYNES. (2001). Evaluation of individual components of plum odor as potential attractants for adult plum curculios. *J. Chem. Ecol.* 27(1): 1-17.
- LESKEY, T.C., A.J. ZHANG et M. HERZOG (2005). Nonfruiting host tree volatile blends: Novel attractants for the plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 34(4): 785-793.
- LESKEY, T.C., J.C. PIÑERO, S. WOOD et R.J. PROKOPY (2008). Odor baited trap trees: a potential management tool for the plum curculio. *J. Econ. Entomol.* 101: 1302-1309.

- LESKEY, T.C., S. WRIGHT, W. ANGER, G. CHOUINARD, D. CORMIER, A. PICHETTE et A. ZHANG (2009). Electroantennogram technique for *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 38(3): 870-878.
- LESKEY, T.C., T.J. HANCOCK et S. WRIGHT (2010). Host Tree-Related Differences in trap captures and electroantennogram activity for the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae). *Can. Entomol.* 142: 284-293.
- LESKEY, T.C., S. WRIGHT, J. SAGUEZ et C. VINCENT (2013). Impact of insecticide and fungicide residue contact on plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* Herbst, mobility and mortality: implications for pest management. *Pest Manag Sci.* 69(4): 464-470.
- LESKEY, T.C., S.E. WRIGHT, V. HOCK, G. CHOUINARD, D. CORMIER, K. LEAHY, D. COOLEY, A. TUTTLE, A. EATON et A. ZHANG (2014). Evaluating electrophysiological and behavioral responses to volatiles for improvement of odor-baited trap-tree management of *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 43(3):753-761.
- LEVINE, E., et F.R. HALL (1977). Effect of feeding and oviposition on apple and plum fruit abscission. *J. Econ. Entomol.* 70:603-607.
- MACRAE, R., M. JUHASZ, J. LANGER et R.C. MARTIN (2006). Ontario goes organic: How to access Canada's growing billion dollar market for organic food. *Government of Canada, World Wildlife Fund Canada and the Organic Agriculture Centre of Canada.* 4: 1-58.
- MAIER, C.T. (1990). Native and exotic rosaceous hosts of apple, plum, and quince curculio larvae (Coleoptera: Curculionidae) in the northeastern United States. *J. Econ. Entomol.* 83: 1326-1332.
- MAMPE, C.D., et H.H. NEUNZIG (1967). The biology, parasitism and population sampling of the plum curculio on blueberry in North Carolina. *J. Econ. Entomol.* 60: 807-812.
- MCCAFFERY, A.R., et I.D. WILSON (1990). « Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones » A.R. McCaffery et I.D. Wilson (éds), *The Chromatographic Society Symposium Series*, New York and London, Plenum press. 390 p.

- MCGIFFEN, M.E. Jr, et J.R. MEYER (1986). Effect of environmental factors on overwintering phenomena and spring migration of the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 15(4): 884–888.
- MESSINA, F.J., et J.A DICKINSON (1993). Egg-laying behavior in divergent strains of the cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae): time budgets and transition matrices. *Annals Entomol Soc. Amer.* 86(2): 207-214.
- MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DES PÊCHERIES ET DE L'ALIMENTATION (2004). Québec, *Monographie de l'industrie de la pomme au Québec*. p. 21-29.
- MØLLER, A.P., et S. LEGENDRE (2001). Allee effect, sexual selection and demographic stochasticity. *Oikos*. 92: 27–34.
- MORI, K., T., NAKAYAMA et H. TAKIKAWA (1996). Synthesis and absolute configuration of sordidin, the male-produced aggregation pheromone of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*. *Tetrahedron Lett.* 37:3741–3744.
- MOSER, J.C. (1976A). Phoretic carrying capacity of flying southern pine beetle (Coleoptera: Scolytidae). *Can. Entomol.* 108(8): 807–808.
- MOSER, J.C. (1976B). Surveying mites (Acarina) phoretic on the southern pine beetle (Coleoptera: Scolytidae) with sticky traps. *Can. Entomol.* 108(8): 809-813.
- MULDER, P.G., B.D. MCCRAW, W. REID et R.A. GRANTHAM (1997). *Monitoring adult weevil populations in pecan and fruit trees in Oklahoma*. Oklahoma, Oklahoma State University Extension Facts Stillwater, F-7,190: 1–8.
- NATURE-ACTION QUÉBEC (2013). Méthodes alternatives de protection des pommiers : principales méthodes applicables pour le jardin domestique et la pomiculture commerciale. Récupéré le 6 avril 2015 de http://www.agrireseau.qc.ca/agriculturebiologique/documents/Methodes_alternatives_protection_pommiers_Nature-Action-Quebec.pdf
- NCEH (2003). Environmental hazards & health effects: Cancer clusters. Récupéré le 6 avril 2015 de <http://www.cdc.gov/nceh/clusters/fallon/organophosfaq.htm#entry>
- OTTE, D. (1974). Effects and functions in the evolution of signaling systems. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 5: 385-417.
- OWENS, E.D., K.I., HAUSCHILD, G.L. HUBBELL et R.J. PROKOPY (1982). Diurnal behavior of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) adults within host trees in nature. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 75: 357–362.

- PARADIS, R.O. (1956). Observations sur le cycle évolutif du charançon de la prune, *Conotrachelus nenuphar* sur la pomme dans le Québec. *Ann. Soc. Entomol. Qc.* 2:60-64.
- PADULA, A.L., et E.H. SMITH (1971). Reproductive incompatibility between univoltine males and multivoltine females of the plum curculio. *Ann. Soc. Entomol. Am.* 64: 665-668.
- PEREAULT, R.J. (2008). *Entomopathogenic fungi and nematodes for Michigan tree fruit management targeting plum curculio (Conotrachelus nenuphar)*. Mémoire de maîtrise en Biologie, Michigan, Michigan State University. 77 p.
- PEREAULT, R.J., M.E. WHALON et D.G. ALSTON (2009). Field efficacy of entomopathogenic fungi and nematodes targeting caged last-instar plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in Michigan cherry and apple orchards. *Environ. Entomol.* 38: 1126-1134.
- PIÑERO, J.C., et R.J. PROKOPY (2003). Field evaluation of plant odor and pheromonal combinations for attracting plum curculios. *J. Chem. Ecol.* 29: 2735-2748.
- PIÑERO, J.C., et R.J. PROKOPY (2004). Predicting plum curculio immigration into apple orchards in Massachusetts: Degrees days versus tree phenology. *Fruit Notes.* 69: 1-7.
- PIÑERO, J.C., et R.J. PROKOPY (2006). Temporal dynamics of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst.) (Coleoptera: Curculionidae), immigration into an apple orchard in Massachusetts. *Environ. Entomol.* 35(2): 413-422.
- PIÑERO, J.C., S. WRIGHT et R.J. PROKOPY (2001). Response of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) to odor-baited traps near woods. *J. Econ. Entomol.* 94(6): 1386-1397.
- PIÑERO J.C., A.M. AGNELLO, A. TUTTLE, T.C. LESKEY, H. FAUBERT, G. KOEHLER, L. LOS, G. MORIN, K. LEAHY, D.R. COOLEY et R.J. PROKOPY (2011). Effectiveness of odor-baited trap trees for plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) monitoring in commercial apple orchards in the Northeast. *J. Econ. Entomol.* 104: 1613-1621.
- PINZÓN-NAVARRO, S., H. BARRIOS, C. MÚRRIA, CH.C. LYAL et A.P. VOGLER (2010). DNA-based taxonomy of larval stages reveals huge unknown

species diversity in neotropical seed weevils (genus *Conotrachelus*): relevance to evolutionary ecology. *Molec. Phylog. Evol.* 56(1): 281–293.

POLAVARAPU, S., V. KYRYCZENKO-ROTH et J.D. BARRY (2004). Phenology and infestation patterns of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) on four highbush blueberry cultivars. *J. Econ. Entomol.* 87: 1899–1905.

PRASUNA, A.L., K.N. JYOTHI, A.R. PRASAD, J.S. YADAV et B. PADMANABAN (2008). Olfactory responses of banana pseudostem weevil, *Odioporus longicollis* Olivier (Coleoptera: Curculionidae) to semiochemicals from conspecifics and host plant. *Cur. Sci.* 94(10): 896–900.

PROKOPY, R.J., et T.C. LESKEY (1997). Do natural sources of odor enhance plum curculio attraction to traps? *Fruit Notes.* 62(1): 1–3.

PROKOPY, R.J., et S. WRIGHT (1997). How do plum curculios approach host trees and pyramid traps? *Fruit Notes.* 62: 5–8.

PROKOPY, R.J., S.S. COOLEY et P.L. PHELAN (1995). Bioassay approaches to assessing behavioral responses of plum curculio adults (Coleoptera: Curculionidae) to host fruit odor. *J. Chem. Ecol.* 21(8): 1073–1084.

PROKOPY, R.J., C.B. WIRTH et T.C. LESKEY (1999). Movement of plum curculio adults toward host trees and traps: fight versus walking. *Entomol. Exper. et Appl.* 91: 385–392.

PROKOPY, R.J., B.W. CHANDLER, T.C. LESKEY et S. WRIGHT (2000). Comparison of six different types of unbaited traps for monitoring plum curculio in orchard. *J. Entomol. Sci.* 35: 411–421.

PROKOPY, R.J., P.L. PHELAN, S.E. WRIGHT, A.J. MINALGA, R. BARGER, T.C. et LESKEY (2001). Compounds from host fruit odor attractive to adult plum curculios (Coleoptera : Curculionidae). *J. Entomol. Sci.* 36(2): 122–134.

PROKOPY, R.J., B.W. CHANDLER, S.A. DYNOK et J. PIÑERO (2003). Odor-baited trees: a new approach to monitoring plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 96: 826–834.

- PROKOPY, R.J., I. JACOME, E. GRAY, G. TRUJILLO, M. RICCI et J.C. PIÑERO. (2004). Using odor-baited trap trees as sentinels to monitor plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in apple orchards. *J. Econ. Entomol.* 97: 511-517.
- QUAINTANCE, A.L., et E.L. JENNE (1912). The plum curculio. USDA, U.S. Department of Agriculture, *Bureau of Entomology Bulletin*, 103. 252 p.
- RACETTE, G. (1988). *Daily activity of plum curculio, Conotrachelus nenuphar (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae), and implications for control*. Mémoire de maîtrise en Biologie, Montréal, McGill University, 290 p.
- RACETTE, G., S.B. HILL et C. VINCENT (1990). Actographs to record the daily activity of the plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 886-907.
- RACETTE, G., G. CHOUINARD, S.B. HILL et C. VINCENT (1991). Activity of adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) on apple trees in spring. *J. Econ. Entomol.* 84: 1827-1832.
- RACETTE, G., CHOUINARD, C. VINCENT et S.B. HILL (1992). Ecology and management of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae), in apple orchards. *Phyto.* 73: 85-100.
- RAMIREZ-LUCAS, P., C. MALOSSE, P.H. DUCROT, M. LETTERE et P. ZAGATTI (1996). Chemical identification, electrophysiological and behavioral activities of the pheromone of *Metamasius hemipterus* (Coleoptera: Curculionidae). *Bioorgan. Med. Chem.* 4: 323-330.
- REDDY, G.V.P., et A. GUERRERO (2010). New pheromones and insect control strategies. *Vitam. Horm.* 83: 493-519.
- REISSIG, W.H., R.W. WEIRES, G.C. FORSHEY, W.L. ROELOFS, R.C. LAMB et H.S. ALDWINCKLE (1984). Insect management in disease resistant dwarf and semi-dwarf apple trees. *Environ. Entomol.* 13: 1201-1207.
- ROCHA, S.L., E. POZO-VELÁZQUEZ, L.R.D'A. FARONI et R.N.C. GUEDES (2009). Phoretic load of the parasitic mite *Acarophenax lacunatus* (Cross & Krantz) (Prostigmata: Acarophenacidae) affecting mobility and flight take-off of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). *J. Stor. Prod. Res.* 45: 261-211.

- ROY, H.E., D.C. STEINKRAUS, J. EILENBERG, A.E. HAJEK et J.K. PELL (2006). Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Ann. Rev. Entomol.* 51: 331-357.
- RUTHER, J., L.M. STAHL, S. STEINER, L.A. GARBE et T. TOLASCH (2007). A male sex pheromone in a parasitic wasp and control of the behavioral response by the female's mating status. *J. Experi. Biol.* 210: 2163-2169.
- SANTÉ CANADA (2013). Protection des insectes pollinisateurs et utilisation responsable des semences traitées. Récupéré le 8 juin 2015 de http://www.agrireseau.qc.ca/references/21/GC/BP_Protection_Pollinisateurs_Semences_Trait%C3%A9es_QC_2013-05-03.pdf
- SARAI, D.S. (1969). Seasonal history of the plum curculio in the Missouri Ozarks. *J. Econ. Entomol.* 62: 1222-1224.
- SAWYER, A.J. (1987). Opportunities for increased biological control in Massachusetts. R. Van Driesche, et E. Carey (éds). *Univ. Mass. Res. Bull.* 718, 141 p.
- SCHOENE, W.J. (1936). Partial second brood of the plum curculio in Virginia. *J. Econ. Entomol.* 29: 571-573.
- SHAPIRO-ILAN, D.I., R.F. III MIZELL et J.F. CAMPBELL (2002). Susceptibility of the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, to entomopathogenic nematodes. *J. Nematol.* 34: 246-249.
- SHAPIRO-ILAN, D.I., T.E. COTTRELL et W.A. GARDNER (2004a). Trunk perimeter applications of *Beauveria bassiana* to suppress adult *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Entomol. Sci* 39: 337-349.
- SHAPIRO-ILAN, D.I., R.F. III MIZELL, T.E. COTTRELL et D.L. HORTON (2004b). Measuring field efficacy of *Steinernema feltiae* and *Steinernema riobrave* for suppression of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* larvae. *Biol. Cont.* 30: 496-503.
- SHAPIRO-ILAN, D.I., R.F. III MIZELL, T.E. COTTRELL et D.L. HORTON (2008). Control of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, with entomopathogenic nematodes: Effects of application timing, alternate host plant, and nematode strain. *Biol. Cont.* 44: 207-215.

- SHELLY, T.E., et T.S. WHITTIER (1997). « Lek behaviour of insects » B. Crespi, et J.C. Choe (éds). *The evolution of mating systems in insects and arachnids*. Cambridge, UK, Cambridge Press, p. 273–293.
- SMART, L.E., M.M. BLIGHT, J.A. PICKETT et B.J. PYE (1994). Development of field strategies incorporating semiochemicals for the control of the pea and bean weevil, *Sitona lineatus* L. *Crop Protect.* 13(2): 127-135.
- SMITH, B.P. (1988). Host-parasite interaction and impact of larval water mites on insects. *Ann. Rev. Entomol.* 33: 487-507.
- SMITH, E.H. (1957). A method for rearing plum curculio under laboratory conditions including some biological observations. *J. Econ. Entomol.* 50(2): 187-190.
- SMITH, E.H., et J.K. FLESSEL (1968). Hibernation of the plum curculio and its spring migration to host trees. *J. Econ. Entomol.* 61(1): 193-203.
- SMITH, E.H., et E.H. SALKELD (1964). Ovary development and oviposition rates in the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 57: 781-787.
- SNAPP, O.I. (1930). Life history and habits of the plum curculio in the Georgia peach belt. *U.S. Dep. Agric. Tech. Bull.* 188: 1–90.
- SNAPP, O.I. (1940). Further studies on plum curculio in the Georgia peach belt. *J. Econ. Entomol.* 33: 453–456.
- SOKOLOV, V.E. (1981). *The Colorado beetle, Leptinotarsa decemlineata* Say phylogeny, morphology, physiology, ecology, adaptation, natural enemies. Nauka, Moscou, Russia. 375 p.
- SPURGEON, D.W. (2003). Age dependence of pheromone production by the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 32(1): 31-38.
- STATISTIQUES CANADA. (2005). *Agriculture and rural working paper series: Pesticide use and pest management practices of Canadian apple growers Research Paper*, Gouvernement du Canada, p.10-20.
- STATISTIQUES CANADA (2008). *Agriculture division crops section : Fruit and vegetable production catalogue*. Gouvernement du Canada, p. 11-18.
- STATISTIQUES CANADA (2012). *Production de fruits et légumes*. Gouvernement du Canada, Catalogue No. 22-003-XWF, vol. 80 no.2. p. 1-43.

- STEARNS, L.A. (1935). The brood of the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* Herbst, in Delaware. *J. Econ. Entomol.* 24: 62-66.
- TEDDERS W.L., et B.W. WOOD (1994). A new technique for monitoring pecan weevil emergence (Coleoptera: Curculionidae). *J. Entomol. Sci.* 29: 18-30.
- TEWARI, S., T.C. LESKEY, A.L. NIELSEN, J.C. PIÑERO et C.R. RODRIGUEZ-SAONA (2014). « Use of Pheromones in insect pest management, with special attention to weevil pheromones ». Dharam P. Abrol (eds.). Integrated pest management: Current concepts and ecological perspective, Academic Press, San Diego. pp. 141-168.
- THOMPSON, J.R. (1932). Sex differentiation of adults of *Conotrachelus nenuphar*. *J. Econ. Entomol.* 25: 807-810.
- TINZAARA, W., C.S. GOLD, M. DICKE, A.V. HUIS, et P.E. RAGAMA (2007). Host plant odours enhance the responses of adult banana weevil to the synthetic aggregation pheromone cosmolure®. *Internat. J. Pest Manage.* 53(2): 127-137.
- TOWERS, P. (2011). Toxic brain chemical must be banned: Health professionals demand EPA take action. Récupéré le 6 avril 2015 de <http://www.panna.org/press-release/toxic-brain-chemical-must-be-banned-health-professionals-demand-epa-take-action>
- TUMLINSON, J.H., D.D. HARDEE, R.C. GUELDNER, A.C. THOMPSON, P.A. HEDIN et J.P. MINYARD (1969). Sex pheromones produced by male boll weevil: isolation, identification, and synthesis. *Sci.* 166: 1010-1012.
- TUMLINSON, J.H., M.G. KLEIN, R.E. DOOLITTLE, T.L. LADD et A.T. PROVEAUX (1977). Identification of the female Japanese beetle sex pheromone: Inhibition of male response by an enantiomer. *Sci.* 197: 789-792.
- VINCENT, C., et N.J. BOSTANIAN (1988). La protection des vergers de pommiers au Québec: état de la question. *Nat. Can. (Rev. Ecol. Syst.)* 115: 261-276.
- VINCENT, C., et M. ROY (1992). Entomological limits to biological control programs in Québec apple orchards. *Acta. Phytopathol. Entomol. Hung.* 27: 649-657.
- VINCENT, C., G. CHOUINARD, N.J. BOSTANIAN et Y. MORIN (1997). Peripheral zone treatments for plum curculio management: validation in commercial apple orchards. *Entomol. Exp. App.* 84: 1-8.

- VINCENT, C., G. CHOUINARD et S.B. HILL (1999). Progress in plum curculio management: a review. *Agric. Ecos. Environ.* 73: 167-175.
- VINCENT, C., G. CHOUINARD et T. LESKEY (2004). « The Plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* Herbst (Coleoptera: Curculionidae) » L. Capinera (éd.) *Encyclopedia of Entomology*, Vol. 3, Dordrecht, The Netherlands, Kluwer. p. 1769-1774.
- VINSON, S.B., et G.F. IWANTSCH (1980). Host Regulation by Insect Parasitoids. *The Quarterly Review of Biology*, 55(2): 143-165.
- WALGENBACH, C.A., et W.E. BURKHOLDER (1986). Factors affecting the response of the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), to its aggregation pheromone. *Environ. Entomol.* 15: 733-738.
- WALGENBACH, C.A., J.K. PHILLIPS, D.L. FAUSTINI et W.E. BURKHOLDER (1983). Male-produced aggregation pheromone of the maize weevil, *Sitophilus zeamais* and interspecific attraction between three *Sitophilus* species. *J. Chem. Ecol.* 9: 831-841.
- WELDON, C.W. (2007). Influence of male aggregation size on female visitation in *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae). *Aust. J. Entomol.* 46: 29-34.
- WHALON, M.E., L.J. GUT, J.E. NUGENT, G. THORNTON et A.B. COOMBS (2000). *Plum curculio in Cherry: The challenge*. Michigan State University. (<http://www.agrireseau.qc.ca/reseaupommier/documents/Whalon%20PC%20Challenges%20Strategies.pdf>)
- WHITCOMB, W.D. (1933). Relation of temperature to the development of the plum Curculio in apples. *J. Econ. Entomol.* 26: 415-419.
- WIGGLESWORTH, V.B. (1953). *The principles of insect physiology*. London, Methuen and Co. Ltd. 546 p.
- WYLIE, W.D. (1951). Technique in jarring for plum curculio. *Econ. Entomol.* 44: 818-819.
- WYLIE, W.D. (1966). Plum curculio nonfruit hosts and survival (Coleoptera: Curculionidae). *J. Kansas Entomol. Soc.* 39: 218-222.
- YONCE, C.E., D.L. HORTON et W.R. OKIE (1995). Spring migration, reproductive behavior, monitoring procedures, and host preference of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) on *Prunus* species in central Georgia. *J. Entomol. Sci.* 30: 82-92.

- ZHANG, X., et D.G. PFEIFFER (2008). Evaluation of reproductive compatibility of interstrain matings among plum curculio populations in the eastern United States. *Envir. Entomol.* 37(5): 1208-1213.
- ZHUGE, P.-P., S.-L. LUO, M.-Q. WANG et G. ZHANG (2010). Electrophysiological responses of *Batocera horsfieldi* (Hope) adults to plant volatiles. *J. App. Entomol.* 134: 600-607.